

▼Title: **JP2002516823T2:**

▼Country: **JP** Japan

▼Kind: **T2**

▼Inventor: see Assignee

▼Assignee: None



High
Resolution

▼Published / Filed: **2002-06-11 / 1999-05-28**

▼Application **JP1999000550834T**

Number:

▼IPC Code: Advanced: **A61K 31/517; A61P 35/00; C07D 239/74; C07D 239/88;**

C07D 239/93; C07D 239/94;

Core: **C07D 239/00;** more...

▼ECLA Code: **C07D239/88; C07D239/94; M07D239/88; M07D239/94;**

▼Priority Number: 1998-05-28 **US1998000087479**

1999-05-28 **WO1999US0011767**

▼INPADOCNone

Buy Now: [Family Legal Status Report](#)






Legal Status:

▼Designated **AL AM AP AZ BA BB BG BR BY CN CU CZ EA EE GD GE GH GM**

Country: **HR ID IN IS AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT**

▼Family:

Buy PDF	Publication	Pub. Date	Filed	Title
	WO99061428C2	2001-10-04	1999-05-28	QUINAZOLINES FOR TREATING BRAIN TUMOR
	WO99061428A1	1999-12-02	1999-05-28	QUINAZOLINES FOR TREATING BRAIN TUMOR
	WO9961428C2	2001-10-04	1999-05-28	QUINAZOLINES FOR TREATING BRAIN TUMOR
	WO9961428A1	1999-12-02	1999-05-28	QUINAZOLINES FOR TREATING BRAIN TUMOR
	US20020161226A1	2002-10-31	2001-07-11	Quinazolines for treating brain tumor
	US6552027	2003-04-22	2001-07-11	Quinazolines for treating brain tumor
	US6316454B1	2001-11-13		
	US6316454	2001-11-13	1999-07-26	6,7-Dimethoxy-4-anilinoquinazolines
	NO20005864A0	2000-11-20	2000-11-20	Quinasoler til behandling av hjernesvulst
	NO20005864A	2001-01-29	2000-11-20	Kinazoliner til behandling av hjernesvulst
	MX2000PA11773A	2002-06-04	2000-11-29	QUINAZOLINES FOR TREATING BRAIN TUMOR.
	MX0011773A	2002-06-04	2000-11-29	QUINAZOLINES FOR TREATING BRAIN TUMOR.
	JP2002516823T2	2002-06-11	1999-05-28	
	IL0139641A0	2002-02-10	1999-05-28	QUINAZOLINES FOR TREATING BRAIN TUMOR
	HU0102793AB	2002-03-28	1999-05-28	QUINAZOLINES FOR TREATING BRAIN TUMOR AND MEDICAMENTS CONTAINING

				THEM
	HU0102793A3	2002-07-29	1999-05-28	QUINAZOLINES FOR TREATING BRAIN TUMOR AND MEDICAMENTS CONTAINING THEM
	HU0102793A2	2002-03-28	1999-05-28	QUINAZOLINES FOR TREATING BRAIN TUMOR AND MEDICAMENTS CONTAINING THEM
	EP1082311A1	2001-03-14	1999-05-28	QUINAZOLINES FOR TREATING BRAIN TUMOR
	CA2333392AA	1999-12-02	1999-05-28	QUINAZOLINES FOR TREATING BRAIN TUMOR
	AU4317399A1	1999-12-13	1999-05-28	Quinazolines for treating brain tumor
20 family members shown above				

Other Abstract
Info:

CHEMABS 132(02)009009M [DERABS C2000-086694](#)

Derwent Title: **Quinazoline compounds used for treating brain tumor**

Original Title: **WO9961428A1: QUINAZOLINES FOR TREATING BRAIN TUMOR**

Assignee: **HUGHES INST WAYNE Non-standard company
PARKER HUGHES INST Non-standard company**

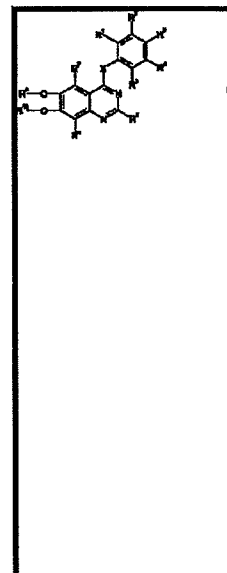
Inventor: **LIU X; NARLA R K; UCKUN F M;**

Accession/
Update: **2000-086694 / 200365**

IPC Code: **A61K 31/505 ; A61K 31/517 ; C07D 239/78 ; C07D 239/94 ;
A61K 31/495 ; A61P 35/00 ; A61P 35/04 ; C07D 239/74 ;
C07D 239/80 ; C07D 239/86 ; C07D 239/88 ; C07D 239/93 ;
C07D 239/95 ;**

Derwent Classes: **B02;**

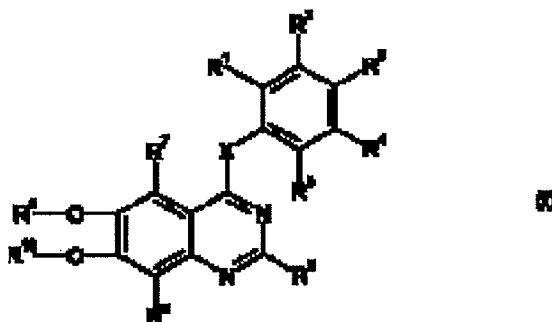
Manual Codes: **B06-D06(Heterocyclic fused ring with 2 rings (both 6
membered) and two N) , B14-H01B(Antiproliferative, inhibitor
of cell division, cytostatic)**



Derwent Abstract: (**WO9961428A**) **Novelty** - Quinazoline compounds used for treating brain tumor cells are hydroxyl- and/or halo- substituted. The compounds can also be bound to targeting moiety to form a conjugate with enhanced cytotoxicity.
Detailed Description - Substituted quinazoline compound used for inhibiting the growth of brain tumor cells and for inhibiting the adhesion and the migration of brain tumor cells is of formula (I):
X = NH, R¹¹N, S, O, CH₂, or R¹¹CH;
R¹¹ = H, 1 - 4C alkyl, or acyl;
R¹, R², R³, R⁴ and R⁵ = H, OH, SH, NH₂, NO₂, halogen, alkoxy, acyl, or 1 - 4C alkylthio, where one or more is OH, SH, or NH₂;
R⁶, R⁷, and R⁸ = H, OH, SH, NH₂, NO₂, acyl of formula -C(OR), 1 - 4C alkoxy, alkylthio or halogens;
R = H, or 1 - 4C alkyl;
R⁹ and R¹⁰ = H, 1 - 4C alkyl, or acyl.
INDEPENDENT CLAIMS are also included for:
(a) a conjugate compound comprising a targeting moiety covalently bonded to the quinazoline compound;
(b) a composition comprising the quinazoline compound or its conjugates, and an isotonic carrier; and
(c) a method for preventing adhesion or migration of brain tumor cells, and for inducing apoptosis of brain tumor cells, comprising contacting the brain tumor cells with the novel compounds.
ACTIVITY - Cytostatic. Substituted quinazoline derivatives were tested against human brain tumor cells. The results showed that those compounds having hydroxy substitution on the phenyl ring, were effective in killing brain tumor cells. While the compounds having both hydroxyl substituent and halogen substituent were also potent cytotoxic agents. It also showed that the addition of bromine atoms significantly increased the cytotoxicity of the compound.
MECHANISM OF ACTION - Brain tumor cell growth inhibitor.
Use - The quinazoline compounds are used for inhibiting the growth of brain tumor cells, and for inducing apoptosis of brain tumor cells, thereby reducing tumor mass. The compounds are also administered to inhibit the adhesion and migration of brain tumor cells, for example, inhibiting the infiltration of normal brain parenchyma by glioblastoma cells.
Advantage - The quinazoline compounds exhibit potent activity against human

glioblastoma cells at micromolar concentrations.

Images:



, Dwg.0/15

Family:	PDF Patent	Pub. Date	Derwent Update
	WO9961428A1 *	1999-12-02	200007
	Des. States: (N) AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH CN CU CZ DE DK EE ES FI GB GD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT UA U (R) AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW NL		
	Local apps.: <u>WO1999US0011767</u> Filed:1999-05-28 (99WO-US11767)		
	US20020161226A1 #	2002-10-31	200279
	Local apps.:		
	US6552027 =	2003-04-22	200330
	Local apps.: Cont of <u>US06316454</u> (US 6316454) <u>US2001000903294</u> Filed:2001-07-11 (2001US-0903294) Cont of <u>US1999000361088</u> Filed:1999-07-26 (99US-0361088) Cont of <u>US1998000087479</u> Filed:1998-05-29 (98US-0087479)		
	MX0011773A1 =	2002-06-01	200365
	Local apps.: Based on <u>WO09961428</u> (WO 9961428) <u>MX2000000011773</u> Filed:2000-11-29 (2000MX-0011773) <u>WO1999US0011767</u> Filed:1999-05-28 (99WO-US11767)		
	HU0102793A2 =	2002-03-28	200234
	Local apps.: Based on <u>WO09961428</u> (WO 9961428) <u>HU2001000002793</u> Filed:1999-05-28 (2001HU-0002793) <u>WO1999US0011767</u> Filed:1999-05-28 (99WO-US11767)		
	US6316454 =	2001-11-13	200173
	Local apps.: <u>US1999000361088</u> Filed:1999-07-26 (99US-0361088) Cont of <u>US1998000087479</u> Filed:1998-05-29 (98US-0087479)		
	EP1082311A1 =	2001-03-14	200116
	Des. States: (R) AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE		
	Local apps.: Based on <u>WO09961428</u> (WO 9961428)		

WO1999US0011767 Filed:1999-05-28 (99WO-US11767)
EP1999000953336 Filed:1999-05-28 (99EP-0953336)

INPADOC [Show legal status actions](#)

Legal Status:

First Claim: [Show all claims](#) Claims We claim: 1. A compound comprising the formula: wherein X is selected from H, alkyl having up to four carbon atoms, or acyl; R, R2, R3, R4 and R5 are the same or consisting of H, OH, SH, NH2, N02, halogen, alkoxy, acyl, and alkylthio, having up to four NH2; R, R7 and R, are the same or different and are each independently selected from alkylthio and halogens, having up to four carbon atoms; and R, and R,, are the same or consisting of H, alkyl or acyl, having up to four carbon atoms.

Priority Number:

Application Number	Filed	Original Title
US2001000903294	2001-07-11	Quinazolines for treating brain tumor
US1999000361088	1999-07-26	6,7-Dimethoxy-4-anilinoquinazolines
US1998000087479	1998-05-29	

Chemical [Show chemical indexing codes](#)
Indexing Codes:

Specific [Show specific compounds](#)
Compound
Numbers:

Related
Accessions:

Accession Number	Type	Derwent Update	Derwent Title
C2000-024138	C		
1 item found			

Title Terms: QUINAZOLINE COMPOUND TREAT BRAIN TUMOUR

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2002-516823
(P2002-516823A)

(43) 公表日 平成14年6月11日 (2002.6.11)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 0 7 D 239/94		C 0 7 D 239/94	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/517		A 6 1 K 31/517	
A 6 1 P 35/00		A 6 1 P 35/00	
C 0 7 D 239/74		C 0 7 D 239/74	
239/88		239/88	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 127 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-550834(P2000-550834)
(86) (22) 出願日 平成11年5月28日 (1999.5.28)
(85) 翻訳文提出日 平成12年11月29日 (2000.11.29)
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 9 / 1 1 7 6 7
(87) 国際公開番号 W O 9 9 / 6 1 4 2 8
(87) 国際公開日 平成11年12月2日 (1999.12.2)
(31) 優先権主張番号 0 9 / 0 8 7 , 4 7 9
(32) 優先日 平成10年5月29日 (1998.5.29)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 パーカー ヒューズ インスティテュート
アメリカ合衆国、55113 ミネソタ州、セ
ント. ポール、ロング レイク ロード
2665
(72) 発明者 ウックン、ファティ、エム.
アメリカ合衆国、55110 ミネソタ州、ホ
ワイト ベアー レイク、イーサン アヴ
ェニュー ノース 12590
(72) 発明者 ナルラ、ラマ、ケイ.
アメリカ合衆国、55113 ミネソタ州、セ
ント. ポール、ラーペンター アヴェニュー
1270
(74) 代理人 弁理士 池内 寛幸 (外3名)
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脳腫瘍の治療のためのキナゾリン

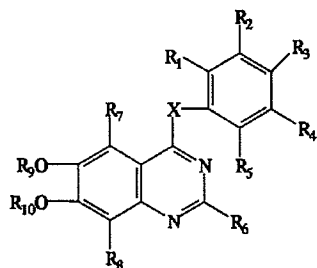
(57) 【要約】

脳腫瘍細胞の成長を阻害し、脳腫瘍細胞の接着および移動を阻害するのに有用な新規なキナゾリン化合物および複合体。本発明の化合物は4- (3'-プロモ-4'-ヒドロキシフェニル) -アミノ-6, 7-ジメトキシキナゾリンおよびE G F と共有結合したこの化合物を含む。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記式で表される化合物。

【化1】



但し、Xは、HN、R₁₁ N、S、O、CH₂およびR₁₁ CHからなる群から選択され；

R₁₁ は、H、炭素数4までのアルキル、またはアシルであり；

R₁、R₂、R₃、R₄およびR₅は、同一でも異なってもよく、それぞれ炭素数4までのH、OH、SH、NH₂、NO₂、ハロゲン、アルコキシ、アシルおよびアルキルチオからなる群から選択され、R₁～R₅の1以上はOH、SH、またはNH₂であり；

R₆、R₇およびR₈は、同一でも異なってもよく、それぞれ炭素数4までのH、OH、SH、NH₂、NO₂、アシル (alcy1)、アルコキシ、アルキルチオ、およびハロゲンからなる群から選択され；

R₉およびR₁₀ は、同一でも異なってもよく、それぞれ炭素数4までのH、アルキル、またはアシルからなる群から選択される。

【請求項2】 R₁、R₂、R₃、R₄またはR₅の少なくとも1つがOHである請求項1に記載の化合物。

【請求項3】 R₁、R₂、R₃、R₄またはR₅の少なくとも1つがハロゲンである請求項1に記載の化合物。

【請求項4】 R₂がOHである請求項1に記載の化合物。

【請求項5】 R₂がCl、BrまたはFである請求項1に記載の化合物。

。

【請求項6】 R₃がOHである請求項1に記載の化合物。

【請求項7】 R_4 が Br、Cl または F である請求項1に記載の化合物

。

【請求項8】 R_9 および R_{10} がそれぞれ CH_3 を含む請求項1に記載の化合物。

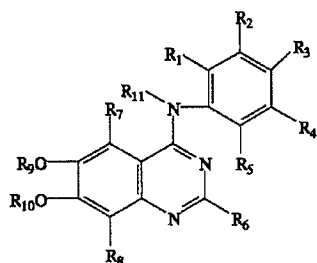
【請求項9】 R_{11} が H を含む請求項1に記載の化合物。

【請求項10】 R_3 が OH であり、 R_2 がハロゲンである請求項1に記載の化合物。

【請求項11】 R_3 が OH であり、 R_2 が Br である請求項1に記載の化合物。

【請求項12】 下記式で表される化合物。

【化2】



但し、 R_{11} は、H または炭素数4までのアルキルであり；

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 および R_5 は、同一でも異なってもよく、それぞれ炭素数4までのH、OH、SH、 NH_2 、 NO_2 、ハロゲン、アルコキシ、アシルおよびアルキルチオからなる群から選択され、 $R_1 \sim R_5$ の1以上がOH、SHまたは NH_2 であり；

R_6 、 R_7 および R_8 は、同一でも異なってもよく、それぞれ炭素数4までのH、OH、SH、 NH_2 、 NO_2 、ハロゲン、アシル (alcyl)、アルコキシ、およびアルキルチオからなる群から選択され；および

R_9 および R_{10} は、同一でも異なってもよく、それぞれ炭素数4までのH、アルキルまたはアシルからなる群から選択される。

【請求項13】 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 または R_5 の少なくとも1つがOH、SHまたは NH_2 である請求項12に記載の化合物。

【請求項14】 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 または R_5 の少なくとも1つがハロゲンである請求項13に記載の化合物。

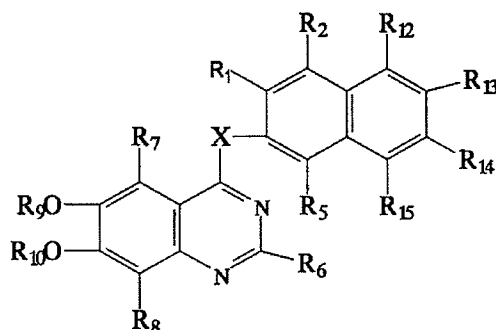
【請求項15】 R_9 および R_{10} のそれぞれが CH_3 を含む請求項12に記載の化合物。

【請求項16】 R_3 がOHであり、 R_2 がハロゲンである請求項12に記載の化合物。

【請求項17】 $R_1 \sim R_5$ を介してフェニル環と融着する第二の環を含む請求項1に記載の化合物。

【請求項18】 下記構造式で表される請求項17に記載の化合物。

【化3】

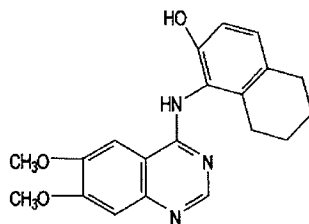


但し、 R_1 、 R_2 、 R_5 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} または R_{15} の1以上がOH、SHまたは NH_2 である。

【請求項19】 R_1 、 R_2 、 R_5 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} または R_{15} の1以上がOHである請求項17に記載の化合物。

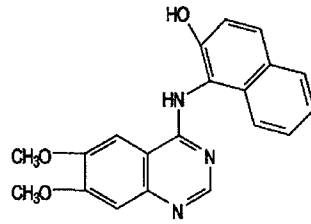
【請求項20】 下記構造式で表される請求項17に記載の化合物。

【化4】



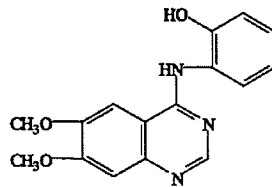
【請求項21】 下記構造式で表される請求項17に記載の化合物。

【化5】



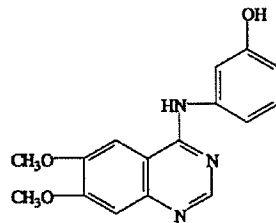
【請求項22】 下記構造式で表される化合物。

【化6】



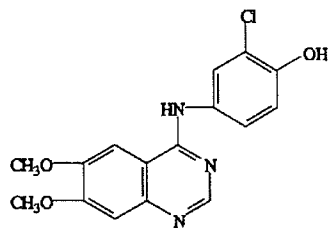
【請求項23】 下記構造式で表される化合物。

【化7】



【請求項24】 下記構造式で表される化合物。

【化8】

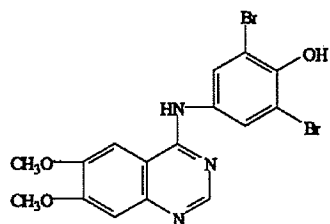


【請求項25】 下記構造式で表される化合物。

【化9】

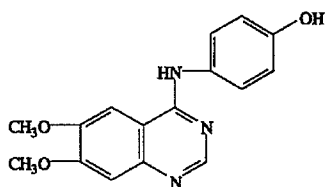
(6)

特表2002-516823



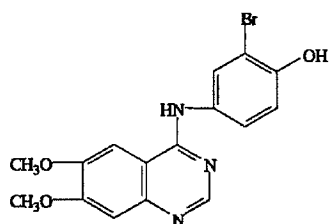
【請求項26】 下記構造式で表される化合物。

【化10】



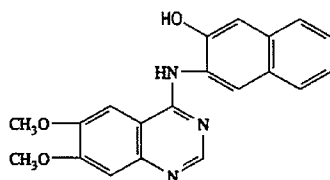
【請求項27】 下記構造式で表される化合物。

【化11】



【請求項28】 下記構造式で表される化合物。

【化12】



【請求項29】 請求項1に記載の化合物と共有結合した標的部分を含む複合化合物。

【請求項30】 前記標的部分が抗体、サイトカインまたは成長因子である請求項29に記載の複合化合物。

【請求項31】 前記標的部分が抗細胞表面受容体抗体である請求項29に記載の複合化合物。

【請求項32】 前記標的部分が表皮成長因子（EGF）である請求項29に記載の複合化合物。

【請求項33】 EGFと共有結合した4-（3'-ブロモ-4'-ヒドロキシフェニル）-アミノ-6,7-ジメトキシキナゾリン[WHI-P154]を含む複合化合物。

【請求項34】 EGFと共有結合した4-（3'-ブロモ-4'-ヒドロキシフェニル）-アミノ-6,7-ジメトキシキナゾリン[WHI-P131]を含む複合化合物。

【請求項35】 EGFと共有結合した4-（3'-ブロモ-4'-ヒドロキシフェニル）-アミノ-6,7-ジメトキシキナゾリン[WHI-P292]を含む複合化合物。

【請求項36】 請求項1に記載の化合物および等張担体を含む組成物。

【請求項37】 請求項12に記載の化合物および等張担体を含む組成物。

【請求項38】 請求項29に記載の化合物および等張担体を含む組成物。

【請求項39】 脳腫瘍細胞を請求項1に記載に記載の化合物と接触させることを含む脳腫瘍細胞のアポトーシスを誘発する方法。

【請求項40】 脳腫瘍細胞を請求項12に記載に記載の化合物と接触させることを含む脳腫瘍細胞のアポトーシスを誘発する方法。

【請求項41】 脳腫瘍細胞を請求項29に記載の複合体と接触させることを含む脳腫瘍細胞のアポトーシスを誘発する方法。

【請求項42】 前記接触が100マイクロモル以上の化合物との接触である請求項39に記載の方法。

【請求項43】 脳腫瘍細胞を請求項1に記載の化合物と接触させること

を含む脳腫瘍細胞の接着または移動を阻害する方法。

【請求項44】 脳腫瘍細胞を請求項12に記載の化合物と接触させることを含む脳腫瘍細胞の接着または移動を阻害する方法。

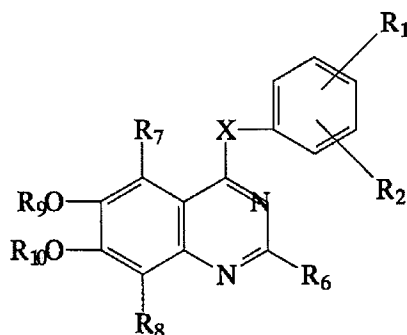
【請求項45】 脳腫瘍細胞を請求項29に記載の化合物と接触させることを含む脳腫瘍細胞の接着または移動を阻害する方法。

【請求項46】 前記接触が100マイクロモル以下の化合物との接触である請求項43に記載の方法。

【請求項47】 脳腫瘍患者にEGFと共有結合した4-(3'-ブromo-4'-ヒドロキシフェニル)-アミノ-6,7-ジメトキシキナゾリンを含む複合化合物を投与することを含む脳腫瘍の治療方法。

【請求項48】 下記構造式で表される化合物。

【化13】



但し、Xは、HN、R₁₁N、CH₂およびR₁₁CHからなる群から選択され；

R₁₁は、H、炭素数4までのアルキル、またはアシルであり、アシルは-C(O R)であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルであり；

R₁は、ハロゲンであり；

R₂は、OHであり；

R₆、R₇およびR₈は、同一でも異なってもよく、それぞれH、OH、SH、NH₂、NO₂、ハロゲン、炭素数4までのアルコキシ、炭素数4までのアルキルチオ、およびアシルからなる群から選択され、アシルは-C(O R)であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルであり；および

R₉およびR₁₀は、同一であっても異なってもよく、それぞれH、炭素数4まで

のアルキル、およびアシルであり、アシルは $-C(OR)$ であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルである。

【請求項49】 XがHNである請求項48に記載の化合物。

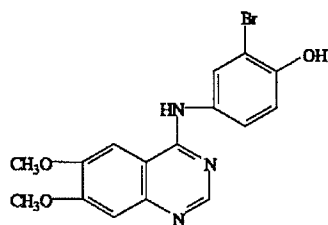
【請求項50】 R_1 がBrである請求項48に記載の化合物。

【請求項51】 R_1 がClである請求項48に記載の化合物。

【請求項52】 R_1 がFである請求項48に記載の化合物。

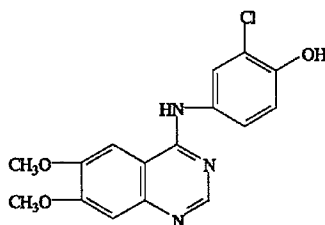
【請求項53】 下記構造式で表される化合物。

【化14】



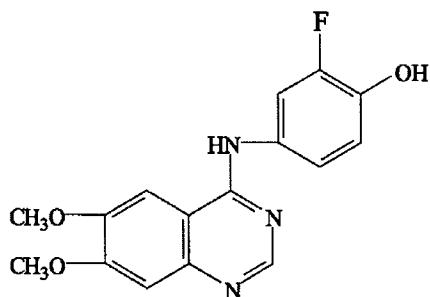
【請求項54】 下記構造式で表される化合物。

【化15】



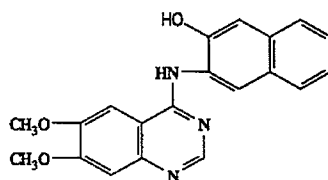
【請求項55】 下記構造式で表される化合物。

【化16】



【請求項56】 下記構造式で表される化合物。

【化17】



【請求項57】 請求項48に記載の化合物および等張担体を含む組成物

。

【請求項58】 請求項53に記載の化合物および等張担体を含む組成物

。

【請求項59】 請求項54に記載の化合物および等張担体を含む組成物

。

【請求項60】 請求項55に記載の化合物および等張担体を含む組成物

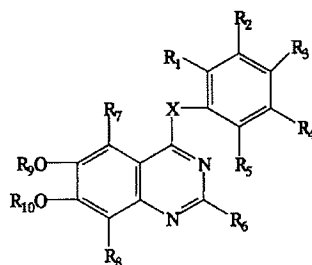
。

【請求項61】 請求項56に記載の化合物および等張担体を含む組成物

。

【請求項62】 脳腫瘍細胞をアポトーシス誘発効果量の下記式で表される化合物と接触させることを含む脳腫瘍細胞のアポトーシスを誘発する方法。

【化18】



但し、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 および R_5 は、同一でも異なってもよく、それぞれH、OH、SH、 NH_2 、 NO_2 、ハロゲン、炭素数4までのアルコキシ、炭素数4までのアルキルチオ、またはアシルであり、アシルは $-C(OR)$ であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルであり、または $R_1 \sim R_5$ のいずれか2つが一緒

になって飽和、不飽和または芳香族の環を形成し、 $R_1 \sim R_5$ の1以上がOHであり；

Xは、HN、 R_{11} N、S、O、 CH_2 および R_{11} CHからなる群から選択され；

R_{11} は、H、炭素数4までのアルキル、またはアシルであり、アシルは $-C(O)$ であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルであり；

R_6 、 R_7 および R_8 は、同一でも異なってもよく、それぞれH、OH、SH、 NH_2 、 NO_2 、ハロゲン、炭素数4までのアルコキシ、炭素数4までのアルキルチオ、およびアシルからなる群から選択され、アシルは $-C(OR)$ であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルであり；および

R_9 および R_{10} は、同一でも異なってもよく、それぞれH、炭素数4までのアルキル、またはアシルからなる群から選択され、アシルは $-C(OR)$ であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルである。

【請求項63】 $R_1 \sim R_5$ の1以上がハロゲンである請求項62に記載の方法。

【請求項64】 $R_1 \sim R_5$ の1以上がBrである請求項63に記載の方法。

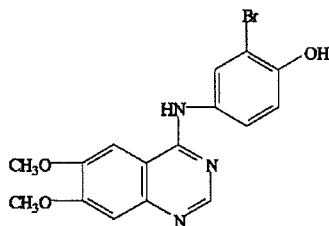
【請求項65】 $R_1 \sim R_5$ の1以上がClである請求項63に記載の方法。

【請求項66】 $R_1 \sim R_5$ の1以上がFである請求項63に記載の方法。

【請求項67】 XがHNである請求項62に記載の方法。

【請求項68】 前記化合物が下記式で表される請求項62に記載の方法。

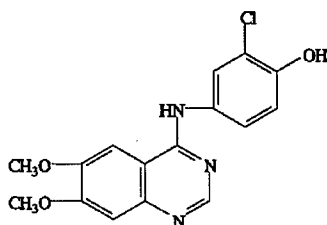
【化19】



【請求項69】 前記化合物が下記式で表される請求項62に記載の方法

。

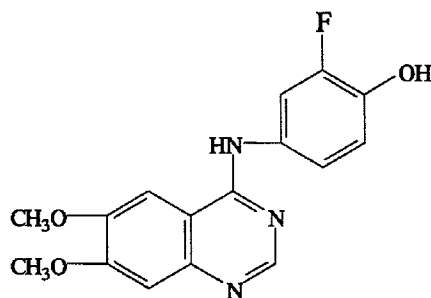
【化20】



【請求項70】 前記化合物が下記式で表される請求項62に記載の方法

。

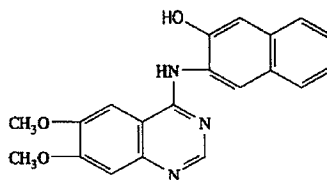
【化21】



【請求項71】 前記化合物が下記式で表される請求項62に記載の方法

。

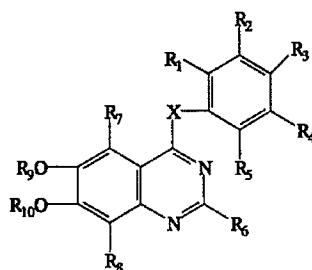
【化22】



【請求項72】 前記接触が100マイクロモル以上の化合物との接触である請求項62に記載の方法。

【請求項73】 脳腫瘍細胞の接着または移動を阻害する方法であって、脳腫瘍細胞を下記式で表される化合物と接触させることを含む方法。

【化23】



但し、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 および R_5 は同一でも異なってもよく、それぞれH、OH、SH、 NH_2 、 NO_2 、ハロゲン、炭素数4までのアルコキシ、炭素数4までのアルキルチオ、またはアシルであり、アシルは $-\text{C}(\text{OR})$ であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルであり、または $R_1 \sim R_5$ のいずれか2つが一緒になって飽和、不飽和または芳香族の環を形成し、 $R_1 \sim R_5$ の1以上はOHであり；

Xは、HN、 $R_{11}\text{N}$ 、S、O、 CH_2 、 $R_{11}\text{CH}$ からなる群から選択され、

R_{11} は、H、炭素数4までのアルキル、またはアシルであり、アシルは $-\text{C}(\text{OR})$ であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルであり；

R_6 、 R_7 および R_8 は、同一でも異なってもよく、それぞれH、OH、SH、 NH_2 、 NO_2 、ハロゲン、炭素数4までのアルコキシ、炭素数4までのアルキルチオ、およびアシルからなる群から選択され、アシルは $-\text{C}(\text{OR})$ であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルであり；および、

R_9 および R_{10} は、同一でも異なってもよく、それぞれH、炭素数4までのアルキル、またはアシルからなる群から選択され、アシルは $-\text{C}(\text{OR})$ であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルである。

【請求項74】 $R_1 \sim R_5$ の1以上がハロゲンである請求項73に記載の方法。

【請求項75】 $R_1 \sim R_5$ の1以上がBrである請求項73に記載の方法。

【請求項76】 $R_1 \sim R_5$ の1以上がClである請求項73に記載の方法。

【請求項77】 $R_1 \sim R_5$ の1以上がFである請求項73に記載の方法

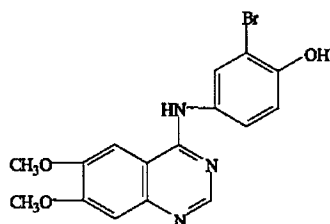
。

【請求項78】 XがHNである請求項73に記載の方法。

【請求項79】 前記化合物が下記式で表される請求項73に記載の方法

。

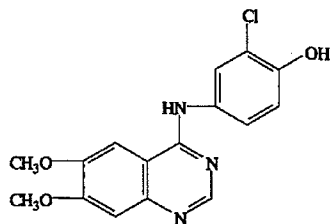
【化24】



【請求項80】 前記化合物が下記式で表される請求項73に記載の方法

。

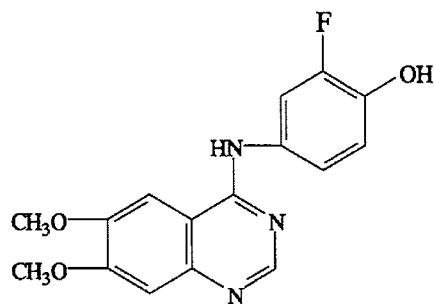
【化25】



【請求項81】 前記化合物が下記式で表される請求項73に記載の方法

。

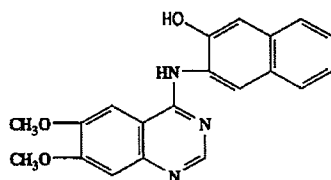
【化26】



【請求項82】 前記化合物が下記式で表される請求項73に記載の方法

。

【化27】



【請求項83】 前記接触が100マイクロモル以上の化合物との接触である請求項73に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、脳腫瘍細胞のアポトーシスを誘発するのに効果的な新規なキナゾリン誘導体に関する。特に本発明は、膠芽腫をはじめとしたヒト脳腫瘍細胞に対する強力な細胞毒性を有する新規なヒドロキシキナゾリン誘導体に関する。本発明の前記新規な化合物はさらに、腫瘍細胞の転移に必要な活動である、脳腫瘍細胞の細胞外マトリックス蛋白質への接着および脳腫瘍細胞の細胞外マトリックスを介しての移動を阻害する。

(発明の背景)

ほとんどの悪性の原発性中枢神経系腫瘍と同じく、高度な未分化の星状細胞腫および多様な膠芽腫(glioblastoma multiforme)は、外科的切除、放射線療法および化学療法を行う現代の集学的治療プログラムに対する反応性が悪く、平均生存率は初診から1年未満である(パードスら、キャンサーメディシン(Pardos, et al., Cancer Medicine)、1997, 1:1471-1514; ブランデスら、キャンサーインベスティゲーション(Brandes, et al., Cancer Invest.)、1996, 14:551-559; フィンレー、ジェー、エル、ペディアトリックニューロ-オンコロジー(Finlay, J. L., 1992, Pediatric Neuro-Oncology,)、278~297; パードスら、セミナーサージカルオンコロジー(Sem. Surgical Oncol.)、1998, 14:88~95)。そのため、これらの非常に予後の悪い脳腫瘍に対する有効な新薬や新規な治療方法を開発することは、翻訳(translational)腫瘍学の研究の主要な焦点として残っている。

【0002】

多様な膠芽腫はまた、局所再発率および死亡率が絶望的に高い、非常に侵襲的な原発性脳腫瘍である。正常脳実質への膠芽腫による浸潤を阻害し得る新薬が緊急に必要とされている。

【0003】

膠芽腫細胞に対する強力な抗腫瘍活性をもつ細胞毒素物質を同定するための体系的な努力の中で、いくつかのヒドロキシ置換キナゾリン誘導体を合成し、それ

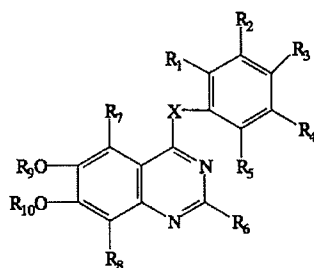
らについてインビトロおよびインビボでのヒト膠芽腫細胞に対する効果を調べた。新規なヒドロキシキナゾリン誘導体およびハローヒドロキシキナゾリン誘導体が、ヒト膠芽腫細胞に対してマイクロモル濃度で強力な細胞毒活性を示すことがわかった。これらの化合物は、例えば、ヒドロキシ化合物およびハロヒドロキシ化合物と表皮成長因子（EGF）等の標的部分と結合して複合体形成することによって、ヒト脳腫瘍細胞の表面を標的とすると、さらに細胞毒活性を高めた（ナノモル濃度）。この複合体は、インビトロにおける膠芽腫細胞のアポトーシスによる死、インビボSCIDマウス膠芽腫異種移植片モデル(xenograft model)における腫瘍のない細胞の有意に高まった生存率、ECM蛋白質への腫瘍細胞の接着の阻害、腫瘍細胞の移動および侵襲活動の阻害を含むより高速かつより強力な抗脳腫瘍活性を示した。

【0004】

したがって本発明は、脳腫瘍細胞に対する強力な細胞毒活性を有する新規な化合物と組成物を含む。本発明の組成物は、効果的な細胞毒性または阻害用量のヒドロキシ置換キナゾリン化合物、特にヒドロキシ置換キナゾリン誘導体またはハロヒドロキシ置換キナゾリン誘導体を含む。本発明の化合物は下記式で表される化合物を含む。

【0005】

【化28】



【0006】

但し、Xは、HN、R₁₁ N、S、O、CH₂またはR₁₁ CHであり、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅の1以上は、OH、SHまたはNH₂である。好ましい態様は、XがHNであり、R₃がOHであり、R₂および／またはR₄がハロゲン、好ましくは

B_rである態様を含む。別の好ましい態様においては、R₁～R₅の1以上はフェニル環と融着する第二の環を形成する。例えば、ナフチル環を形成し、少なくとも1つのヒドロキシ置換基を有する。

【0007】

本発明の好ましい細胞毒素化合物は、4-（3'-ブromo-4'-ヒドロキシフェニル）-アミノ-6,7-ジメトキシキナゾリン[WHI-P154]、4-（4'-ヒドロキシフェニル）-アミノ-6,7-ジメトキシキナゾリン[WHI-P131]および4-（2'-ヒドロキシナフチル-3'）-アミノ-6,7-ジメトキシキナゾリン[WHI-P292]を含む。

【0008】

本発明の化合物は、薬学的組成物として対象物に供給できるように作製され、好ましくは、抗細胞表面抗原抗体などの細胞特異的標的部分、またはEGF等の細胞表面受容体として知られている部分と結合することによって、脳腫瘍細胞を選択的に殺傷するように修飾されている。本発明の化合物は、好ましくは、標的部分と共有結合している。標的部分の1つの例はEGFであり、それは、本発明の化合物と結合すると、高速かつ特異的に前記化合物をEGF受容体を発現する脳腫瘍細胞に向け、その結果、特異的、高速かつ高められた細胞毒性を発揮する。

【0009】

本発明の化合物を対象患者に投与すると、脳腫瘍細胞の成長を阻害し、脳腫瘍細胞のアポトーシスを誘発し、それによって腫瘍を小さくする。また本発明の化合物を投与すると、脳腫瘍細胞の接着および移動を阻害する、例えば、正常脳実質への膠芽腫細胞の浸潤を阻害する。

【0010】

（発明の詳細な説明）

本発明は、膠芽腫細胞をはじめとした脳腫瘍細胞に対する細胞毒素として強力な活性を有する新規なヒドロキシ置換キナゾリン誘導体を含む。さらに、本発明のヒドロキシ置換キナゾリン化合物は、腫瘍細胞の転移に必要な活動である腫瘍細胞の接着および移動の強力なインヒビターである。

定義

本願で使用される全ての科学のおよび技術的用語は、特に記載のない限り、当該分野で通常使用されている意味を表すものとする。本願では下記の用語もしくはフレーズは明記された意味で用いるものとする。

【0011】

ここで使用される「アルキル」は、特定数の炭素原子を持つ飽和脂肪族炭化水素基の分枝鎖および直鎖の双方を含む。好ましい態様としては、炭素数1～4の鎖、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、第二級ブチル、*t*-ブチル等が挙げられる。

【0012】

ここで使用されている「アルケン」は、特定数の炭素原子を持つ不飽和脂肪族炭化水素基の分枝鎖および直鎖の双方を含む。炭素数1～4の鎖が好ましい。

【0013】

ここで使用される「アシル」は、 $-C(O)R$ であり、*R*はH、アルキルまたは炭素数1～4のアリールである。

【0014】

ここで使用される「ハロゲン」は、フルオロ、クロロ、ブロモおよびヨードを含む。好ましいハロゲンもしくはハロ置換基はBrである。

【0015】

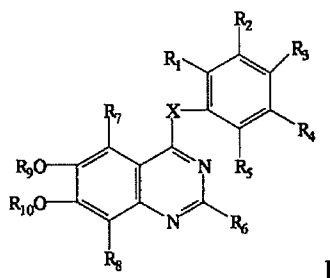
ここで使用される「薬学的に受け入れられる担体」とは、本発明の化合物と結合したとき、その化合物の生物学的活性、例えば、脳腫瘍細胞のアポトーシスを誘発する能力を維持することができ、対象となる免疫系とは反応しないすべての物質を含む。例えば、リン酸緩衝食塩水溶液、水、油／水乳剤等の乳剤、および様々な種類の湿潤剤といった標準的な薬学的担体のいずれかが挙げられるが、これらに限定されない。そのような担体を含む組成物は、公知の従来の方法によって作製される（例えば、レミングトン ファーマスーティカルサイエンス、43章、14版、マックパブリッシング社、イーストン、ペンシルベニア州（Remington's Pharmaceutical Sciences, Chapter 43, 14th Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA））。

本発明の化合物

本発明の新規な置換キナゾリンは、下記式 I で表される一般的な構造を持つ。

【0016】

【化29】



【0017】

但し、Xは、HN、R₁₁N、S、O、CH₂およびR₁₁CHからなる群から選択される。R₁₁は、H、炭素数4までのアルキル、またはアシルである。XはNHであることが好ましく、R₁₁はHであることが好ましい。

【0018】

R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇およびR₈は、それぞれH、OH、SH、NH₂、NO₂、アルコキシ、アルキルチオおよびハロゲンである。R₉およびR₁₀は、それぞれ炭素数4までのH、アルキルまたはアシルからなる群から選択される。R₉およびR₁₀はメチルであることが好ましい。

【0019】

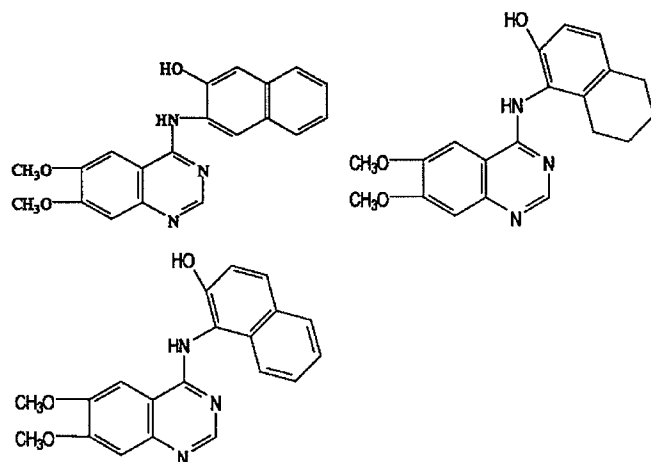
R₁、R₂、R₃、R₄、R₅の少なくとも1つはOHである。また、R₁～R₅の少なくとも1つはSHまたはNH₂等の化合物である。

【0020】

別の実施形態によれば、R₁～R₅の1以上はフェニル環と融着する第二の環を形成する。例えば、下記式で表される化合物はR₁～R₅を介してフェニル環と融着する第二の環を含む。

【0021】

【化30】



【0022】

化合物の例

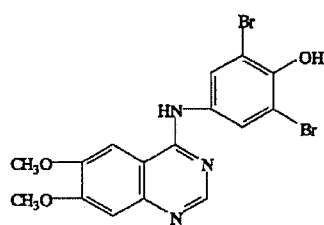
本発明の化合物のいくつかの例をキャラクタリゼーションデータと共に記載する。

【0023】

【化31】

4-(3',5'-ジブromo-4'-ヒドロキシルフェニル)-アミノ-6,7-ジメトキシキノゾリン

[WHI-P97]

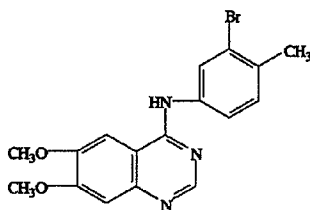


収率 72.80%; 融点 >300.0 °C. UV(MeOH) λ_{max} : 208.0, 210.0, 245.0, 320.0 nm; IR(KBr) ν_{max} : 3504(br), 3419, 2868, 1627, 1512, 1425, 1250, 1155 cm^{-1} ; ^1H NMR(DMSO- d_6): δ 9.71(s, 1H, -NH), 9.39(s, 1H, -OH), 8.48(s, 1H, 2-H), 8.07(s, 2H, 2', 6'-H), 7.76(s, 1H, 5-H), 7.17(s, 1H, 8-H), 3.94(s, 3H, -OCH₃), 3.91(s, 3H, -OCH₃). GC/MS m/z 456($M^+ + 1$, 54.40), 455(M^+ , 100.00), 454($M^+ - 1$, 78.01), 439($M^+ - \text{OH}$, 7.96), 376($M^+ + 1 - \text{Br}$, 9.76), 375($M^+ - \text{Br}$, 10.91), 360(5.23). 分析値 ($\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{Br}_2\text{N}_3\text{O}_3$) C, H, N.

【0024】

【化32】

4-(3'-ブromo-4'-メチルフェニル)-アミノ-6,7-ジメトキシキナゾリン [WHI-P111]



収率 82.22 %; 融点. 225.0-228°C. ^1H

NMR(DMSO- d_6): δ 10.23(s, 1H, -NH), 8.62(s, 1H, 2-H), 8.06(D, 1H, $j_{2',6'}=2.1$ Hz, 2'-H), 7.89(s, 1H, 5-H), 7.71(dd, 1H, $J_{5',6'}=8.7$ Hz, $J_{2',6'}=2.1$ Hz, 6'-H), 7.37(d, 1H, $J_{5',6'}=8.7$ Hz, 5'-H), 7.21(s, 1H, 8-H), 3.96(s, 3H, -OCH₃), 3.93(s, -OCH₃).

UV(MeOH) λ_{max} (ϵ): 204.0, 228.0, 255.0, 320.0 nm.

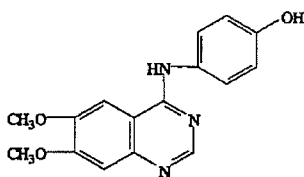
IR(KBr) ν_{max} : 3431, 3248, 2835, 1633, 1517, 1441, 1281, 1155 cm^{-1} . GC/MS m/z 375($M^+ + 1$, 76.76), 374(M^+ , 100.00), 373($M^+ - 1$, 76.91), 358($M^+ + 1$ -OH, 11.15), 357(1.42), 356(6.31). 分析値.

(C₁₇H₁₆BrN₃O₂HCl) C, H, N.

【0025】

【化33】

4-(4'-ヒドロキシルフェニル)-アミノ-6,7-ジメトキシキナゾリン [WHI-P131]



収率 84.29%; 融点. 245.0-248.0°C.

UV(MeOH) λ_{max} : 203.0, 222.0, 251.0, 320.0 nm;

IR(KBr) ν_{max} : 3428, 2836, 1635, 1516, 1443, 1234 cm^{-1} ; ^1H NMR(DMSO- d_6): δ 11.21(s, 1H, -NH),

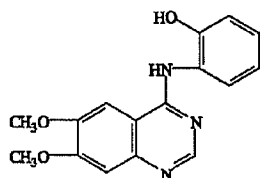
9.70(s, 1H, -OH), 8.74(s, 1H, 2-H), 8.22(s, 1H, 5-H), 7.40(d, 2H, $J = 8.9$ Hz, 2',6'-H), 7.29(s, 1H, 8-H), 6.85(d, 2H, $J = 8.9$ Hz, 3',5'-H), 3.98(s, 3H, -OCH₃), 3.97(s, 3H, -OCH₃).

GC/MS m/z 298 ($M^+ + 1$, 100.00), 297(M^+ , 26.56), 296($M^+ - 1$, 12.46). 分析値. (C₁₆H₁₅N₃O₃HCl) C, H, N.

【0026】

【化34】

4-(2'-ヒドロキシルフェニル)-アミノ-6,7-ジメトキシキノゾリン [WHI-P132]

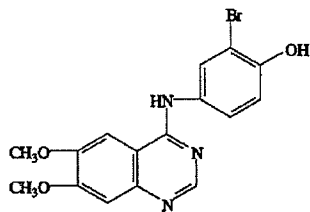


収率 82.49%; 融点. 255.0-258.0 °C. ^1H NMR(DMSO- d_6): δ 9.78(s, 1H, -NH), 9.29(s, 1H, -OH), 8.33(s, 1H, 2-H), 7.85(s, 1H, 5-H), 7.41-6.83(m, 4H, 3', 4', 5', 6'-H), 7.16(s, 1H, 8-H), 3.93(s, 3H, -OCH₃), 3.92(s, 3H, -OCH₃). UV(mEoh) λ_{max} (ϵ): 203.0, 224.0, 245.0, 335.0 nm. IR(KBr) ν_{max} : 3500 (br), 3425, 2833, 1625, 1512, 1456, 1251, 1068 cm^{-1} . GC/MS m/z 298(M^+ +1, 8.91), 297(M^+ , 56.64), 281(M^+ +1- OH, 23.47), 280(M^+ - OH, 100.00). 分析値. ($\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3\text{HCl}$) C, H, N.

【0027】

【化35】

4-(3'-ブromo-4'-ヒドロキシルフェニル)-アミノ-6,7-ジメトキシキノゾリン [WHI-P154]

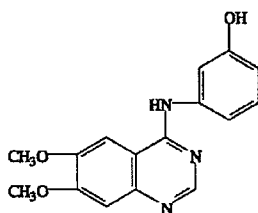


収率 89.90%; 融点. 233.0-233.5 °C. UV(MeOH) λ_{max} : 203.0, 222.0, 250.0, 335.0 nm; IR(KBr) ν_{max} : 3431 br, 2841, 1624, 1498, 1423, 1244 cm^{-1} ; ^1H NMR(DMSO- d_6): δ 10.08(s, 1H, -NH), 9.38(s, 1H, -OH), 8.40(s, 1H, 2-H), 7.89(d, 1H, $J_{2',5'} = 2.7\text{Hz}$, 2'-H), 7.75(s, 1H, 5-H), 7.55(dd, 1H, $J_{5',6'} = 9.0\text{Hz}$, $J_{2',6'} = 2.7\text{Hz}$, 6'-H), 7.14(s, 1H, 8-H), 6.97(d, 1H, $J_{5',6'} = 9.0\text{Hz}$, 5'-H), 3.92(s, 3H, -OCH₃), 3.90(s, 3H, -OCH₃). GC/MS m/z 378(M^+ +2, 90.68), 377(M^+ +1, 37.49), 376(M^+ , 100.00), 360(M^+ , 3.63), 298(18.86), 282 (6.65). 分析値. ($\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_3\text{HCl}$) C, H, N.

【0028】

【化36】

4-(3'-ヒドロキシルフェニル)-アミノ-6,7-ジメトキシキノズリン [WHI-P180]



収率 71.55 %; 融点. 256.0- 258.0 °C.

^1H NMR(DMSO- d_6): δ 9.41(s, 1H, -NH), 9.36(s, 1H, -OH), 8.46(s, 1H, 2-H), 7.84(s, 1H, 5-H), 7.84-6.50(m, 4H, 2', 4', 5', 6' -H), 7.20(s, 1H, 8-H), 3.96(s, 3H, -OCH₃), 3.93(s, 3H, -OCH₃).

UV(MeOH) λ_{max} (ϵ): 204.0, 224.0, 252.0, 335.0 nm.

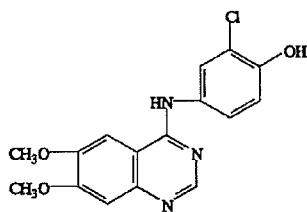
IR(KBr) ν_{max} : 3394, 2836, 1626, 1508, 1429, 1251 cm^{-1} . GM/MS m/z: 297(M^+ , 61.89), 296(M^+ , 61.89), 296($\text{M}^+ - 1$, 100.00), 280($\text{M}^+ - \text{OH}$, 13.63).

分析値. ($\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3 \cdot \text{HCl}$) C, H, N.

【0029】

【化37】

4-(3'-クロロ-4'-ヒドロキシルフェニル)-アミノ-6,7-ジメトキシキノズリン [WHI-P197]



収率 84.14%; 融点. 245.0°C(dec). ^1H

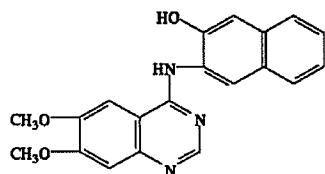
NMR(DMSO- d_6): δ 10.00(s, 1H, -NH), 9.37(s, 1H, -OH), 8.41(s, 1H, 2-H), 7.78(s, 1H, 5-H), 7.49(d, 1H, $J_{2,6}=2.7$ Hz, 2'-H), 7.55(dd, 1H, $J_{5,6}=9.0$ Hz, $J_{2,6}=2.7$ Hz, 6'-H), 7.16(s, 1H, 8-H), 6.97(d, 1H, $J_{5,6}=9.0$ Hz, 5'-H), 3.93(s, 3H, -OCH₃), 3.91(s, 3H, -OCH₃). UV(MeOH) λ_{max} (ϵ): 209.0, 224.0, 249.0, 330.0 nm. IR(KBr) ν_{max} : 3448, 2842, 1623, 1506, 1423, 1241 cm^{-1} . GC/MS m/z: 341(M^+ , 100.00), 326($\text{M}^+ - \text{CH}_3$, 98.50), 310($\text{M}^+ - \text{OCH}_3$, 12.5), 295(9.0), 189(13.5), 155(13.8). 分析値.

($\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{ClN}_3\text{O}_3 \cdot \text{HCl}$) C, H, N.

【0030】

【化38】

4-(2'-ヒドロキシ-ナフチル-3')-アミノ-6,7-ジメトキシキノリン [WHI-P292]



収率 87.41%; 融点.277.0-279.0°C, IR(KBr) ν_{\max} : 3479, 3386, 3036, 2901, 1632, 1581, 1504, 1437, 1281 cm^{-1} . ^1H NMR(DMSO- d_6): δ 11.38(s, 1H, -NH), 10.35(s, 1H, -OH), 8.73(s, 1H, 2-H), 8.25(s, 1H, 5-H), 7.93-7.30(m, 6H, 1', 4', 5', 6', 7', 8'-H), 7.37(s, 1H, 8H), 4.00(s, 6H, -OCH₃). GC/MS m/a: 281(41.0), 253(11.0), 207(100.0). 分析値. (C₂₀H₁₇N₃O₃·HCl) C, H, N.

【0031】

細胞毒性化合物

下記実施例に示すように、フェニル環 (R₁ ~ R₅) 上のヒドロキシ置換基は、本発明の新規な置換化合物の細胞毒素作用に必要であり、この環の第二置換基、例えば、ブロミン (Br) 等のハロゲンは前記化合物の細胞毒素作用を高める。本発明の方法において、これらの化合物の細胞毒素作用は、脳腫瘍細胞をマイクロモル量の前記阻害化合物に接触させることによって達成される。特に有用な細胞毒素化合物としては、WHI-P154 (3-Br、4-OH置換)、WHI-P131 (4-OH置換) およびWHI-P292 (1-OHナフタレン置換) が挙げられる。ナノモル濃度で細胞毒活性を示す、これらの化合物とEGF等の標的部分との複合体が特に有用である。

【0032】

上記のように、本発明の方法に有用な化合物は、上記ヒドロキシ置換基の代わりにSHまたはNH₂によって置換されたものも含む。

接着／移動を阻害するための化合物

下記実施例において、脳腫瘍細胞の細胞外マトリックスへの接着および腫瘍細胞の移動のインヒビターである、本発明のヒドロキシ置換キノリン化合物の有用性を更に説明する。フェニル環にヒドロキシ置換基を有する各試験化合物は、膠芽腫細胞の接着／移動に対して阻害活性を示した。特に、強力かつ有用な阻害化合物は、WHI-P154、WHI-P131およびWHI-P292を含む。

【0033】

本発明の有用な化合物が脳腫瘍細胞の接着／移動を阻止する能力を有するかどうかを下記実施例に記載のアッセイによって試験した。そのようなアッセイにおいては、阻害化合物の存在下での細胞の細胞外マトリックス蛋白質への結合の阻害と阻害化合物を含まない対照との比較；脳腫瘍細胞のマトリーゲルマトリックス (Matrigel Matrix) へ侵襲の阻害 (アルビニら、キャンサーリサーチ、1987、47:3239) に記載の方法による)；および阻害化合物の存在下での局所接着ブランクおよびアクチン重合化の阻害の阻害化合物を含まない対照との比較とを行う。阻害化合物と標的部分 E G F との結合によって、化合物 W H I - P 1 5 4 の阻害活性は高められた。

【0034】

本発明の方法においては、脳腫瘍細胞をほぼマイクロモル濃度の阻害化合物と接触させて、腫瘍細胞の非疾患組織への接着および侵襲／移動を阻害する。これは、例えば、細胞が分散している可能性のある切除術において重要である。細胞が、進行性の悪性脳腫瘍細胞と結合した E C M と接着すると、その接着部位に新たな腫瘍を成長させることがある。本発明の化合物を投与することにより、接着および移動が阻害され、新しい腫瘍の成長が阻害される。

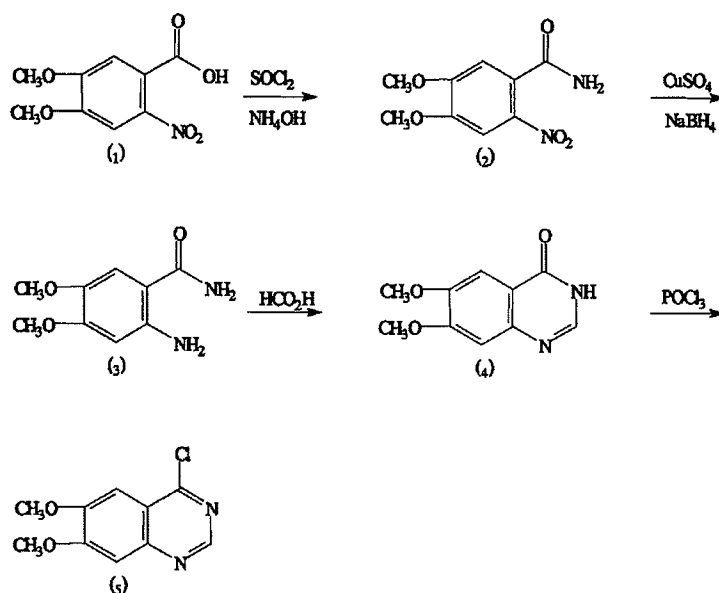
新規なヒドロキシ置換キナゾリン誘導体の合成

本発明のヒドロキシ置換キナゾリン誘導体は、重要な開始物質、4-クロロ-6, 7-ジメトキシキナゾリンから、既知の方法によって合成することができる (ノモトラ、ケミカルファーマスーティカルブレティン (Nomoto, et al., Chem. Pharm. Bull.), 1990、38:1591~1595)；トーマス、シー エル、アカデミックプレス、ニューヨーク、ニューヨーク州、「I. キナゾリン誘導体の合成」 (Thomas, C. L., 1970, Academic Press, New York, NY, "I. Synthesis of quinoxaline derivatives")。下記スキーム I に概略を示し、下記実施例において詳細に示した。

【0035】

【化39】

スキーム1



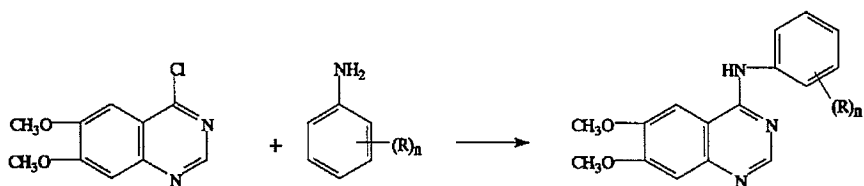
【0036】

4-クロロ-6, 7-ジメトキシキノザリンを、下記スキーム2に示すように、適切な置換アニリンと縮合することによって本発明の化合物を調製する。

【0037】

【化40】

スキーム2



R = 置換基; n = 数

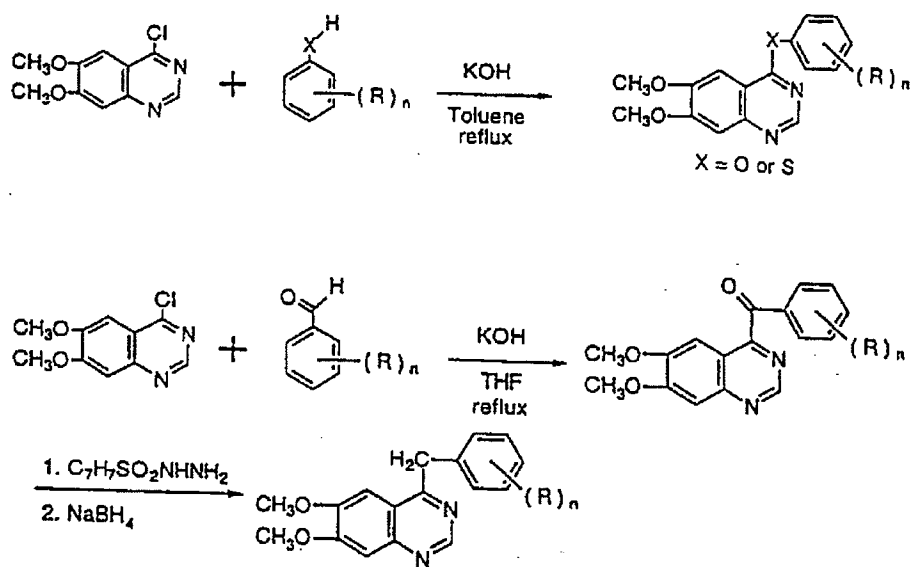
【0038】

同様にして、本発明の化合物（但し、XはSまたはO、あるいはXは、 CH_2 のようなアルキルである）を前駆体化合物から合成し、環部分を望ましい置換基と反応させ、望ましい生成物を得る。これらの合成方法は従来技術として公知であり、例えば下記スキーム3に示した方法がある。

【0039】

【化41】

スキーム3



【0040】

本発明の複合体

「複合体」という語は、2以上の分子の複合物として形成される化合物を意味する。より具体的には、本発明においては、新規なヒドロキシ置換キナゾリン誘導体が、例えば共有結合によって、細胞特異的標的部分に結合し、関心のある細胞に薬物を効率的かつ特異的に輸送するための複合化合物を形成する。

標的部分

「標的部分」という表現は、本発明の化合物を望ましい活動を行う特異的な部位に送達する機能を果たす分子を意味する。標的部位としては、例えば、特異的な細胞表面上の分子と特異的に結合する分子が挙げられる。本発明に有用なそのような標的部分は、抗細胞表面抗原抗体、EGF等の細胞表面受容体とその受容体EGF-Rとを結合させる成長因子を含む。インターロイキンをはじめとしたサイトカイン類および顆粒球／マクロファージ刺激因子類(GMCSF)のような因子も特異的な標的部分であり、特異的な細胞と結合し、高レベルで受容体を

発現することがわかっている。

表皮成長因子 (EGF) およびその受容体 (EGF-Rc)

ヒト表皮成長因子 (hEGF) は、非常に純度の高い形で市販されている。例えば、アップステートバイオテクノロジーインク (Upstate Biotechnology Inc.) (レークプラシド、ニューヨーク州 (Lake Placid, NY) (ロット番号 01-107C))。この蛋白質リガンドは、EGF 反応性細胞の表面に位置する受容体に特異的かつ高い親和性で結合することが知られている。EGF-Rc の発現は、過形成ネオインチマ (neointima) 細胞をはじめとした EGF 反応性細胞において増加する。

【0041】

本発明の複合体においては、組換えヒト EGF (hrEGF) を使用することが好ましい。しかし、ネオインチマ細胞上の hEGF-Rc と特異的に結合する hEGF および hEGF 類似体も複合したとき同様に血管細胞の移動および過形成ネオインチマ細胞の成長を阻害をすることが予測される。

【0042】

ヒト表皮成長因子 (EGF) は、53 アミノ酸一本鎖 6216 ダルトンポリペプチドであり、それは特異的な 170 kDa 細胞膜表皮成長因子受容体 (EGF-受容体/Erbb-1) と結合することによって、生物学的作用を示す (フィックス エス ビー、ブレストキャンサーリサーチアンドトリートメント (Fix, S.B., Breast Cancer Research & Treatment)、1994、29:41~49; アープら (Earp et al.)、ブレストキャンサーリサーチアンドトリートメント、1995、35:115-132; ライトら、ジャーナルオブバイオリジカルケミストリー (Wright, et al., 1995, J. Biol. Chem.)、270:12085~12093; ブルームおよびハンター、1996、ジャーナルオブバイオリジカルケミストリー (Broome and Hunter, 1996, J. Biol. Chem, 271:16798-16806)。ヒト EGF 受容体は、システイン含有量が高くかつ N-グリコシド結合を多く含む細胞外ドメインと、単一膜貫通ドメイン、および蛋白質チロシンキナーゼ (PTK) 活性を有する細胞質ドメインから構成される。

【0043】

E G FがそのE G F-受容体／E r b B-1)と結合することで、受容体において、それ自身による、もしくはE r b-B (サブタイプI) 膜貫通P T Kファミリーの他のメンバー（例えば、E r b-B 2、E r b-B 3)との二量重合が起こる。その結果、P T Kドメインのオートホスホリレーションによる活性化が起こる（ムジュウオーミー、エス ケー、モレキュラーアンドセルラーバイオロジー(Muthuswamy, S.K., Molecular & Cellular Biology)、1994、14:735～743；オッテンホッフカーフら、キャンサーリサーチ (Ottenhoff-Kalff et al., Cancer Research)、1992、52:4773-4778)。E G F受容体は物理的および機能的にp 60^{src}を含むS r c前がん遺伝子ファミリーP T Kと結合する（ムジュウオーミー、エス ケー、モレキュラーアンドセルラーバイオロジー、1994、14:735-743；オッテンホッフカーフら、キャンサーリサーチ、1992、52:4773-4778；アキヤマら、ジャーナルオブバイオロジカルケミストリー (Aikyama et al., J. Biol. Chem.,)、1987、262:5592～5595)。この結合は、E G F受容体によって媒介される信号事象の一部分だと考えられる（オッテンホッフカーフら、キャンサーリサーチ、1992、52:4773-4778）。

複合体の形成

本発明の複合体を形成するために、標的部分をヒドロキシ置換キナゾリン化合物と共有結合させた。前記標的部分は、ポリペプチド分子であることが多いが、それは本発明の化合物と例えば、NH₂、SH、CHO、COOH等の結合部位において結合する。特異的な結合物質を化合物と結合するために使用することができる。好ましい結合物質は、標的部分が付着されうる反応部位にしたがって選択することができる。

【0044】

適切な結合物質をおよび標的部分が本発明の化合物に付着する反応部位を選択する方法は公知であり、例えば、ハーマンソンら、バイオコンジュゲートテクニック、アカデミックプレス (Hermanson, et al., Bioconjugate Techniques, Academic Press)、1996；ハーマンソンら、イモビライズトアフィニティリガンドテクニック (Immobilized Affinity Ligand Techniques)、アカデミックプレス、1992；およびピアスカタログおよびハンドブック (Pierce Catalog and Handb

ook)、1996, pp. T155-T201に記述されている。EGFを複合する方法の1例を下記実施例に示す。

投与方法

本発明の複合体は薬学的組成物として形成され、選択された投与経路および小さな分子もしくはその複合体の投与に好適な方法に適応される様々な形でヒト患者を含む哺乳動物宿主に投与される。好ましい投与経路としては、経口投与、非経口投与ならびに静脈注射、筋肉注射、または皮下注射経路を含む。

【0045】

本発明の複合体は非経口投与、即ち、注入または注射によって静脈または腹腔内注射で投与することが好ましい。本発明の一実施例においては、前記化合物は、腫瘍に腫瘍注射によって直接前記化合物を脳、例えば、脳室液に注入することによって、または静脈注射で全身投与によって投与できる。複合体を含む本発明の化合物は、脳一血液関門を介して脳にアクセスし易い大きさおよび組成をもつ。

【0046】

複合体の溶液または懸濁液を水、等張食塩水(PBS)で調製し、任意に非毒性界面活性剤と混合してもよい。分散液はグリセロール、液体ポリエチレン、グリコール、DNA、植物油、トリアセチンおよびそれらの混合物で調製できる。通常の保存および使用条件において、これらの調製物は微生物の成長を阻止するための防腐剤を含有してもよい。

【0047】

注射または注入に使用するため好適な薬学的投与剤型としては、無菌の水溶液もしくは分散液もしくは無菌粉末を挙げることができる。それらは、無菌注射／注入可能な溶液または分散液の即時調製に適用される活性成分を含む。すべての場合に於いて、最終的な投与剤型は、製造および保存条件において、無菌であり、液体であり、安定しているべきである。液体担体もしくはベヒクルは、溶媒もしくは液体分散媒体であり、例えば、水、エタノール、グリセロール、プロピレングリコールまたは液体ポリエチレングリコール類等のポリオール、植物油類、非毒性グリセリルエステル類、およびそれらの好適な混合物を含む。例えば、適

切な流動性の維持は、リポソームの形成によって、分散液の場合は必要な粒径の維持によって、または非毒性界面活性剤の使用によって行うことができる。微生物の活動は、様々な抗菌および抗カビ物質、例えば、パラベン類、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等によって阻害することができる。多くの場合、等張物質、例えば、糖、緩衝剤もしくは塩化ナトリウムを含むことが望ましいだろう。注射可能組成物の長時間吸収は、組成物中に吸収を遅らせる物質、例えばアルミニウムモノステラート (monostearate) ヒドロゲル類やゼラチンを含むことによって達成できる。

【0048】

無菌注射可能溶液は、複合体を必要な量で、適切な溶媒に、上記様々な成分で、必要に応じて、組み込むことによって調製し、続いて必要に応じ濾過無菌処理を行う。無菌注射可能な溶液の調製用の無菌粉末の場合、好ましい調製方法は真空乾燥法および凍結乾燥法であり、それは、従前の無菌濾過溶液中に存在する活性成分および追加的な望ましい成分の粉末を生成する。

腫瘍の治療

本発明の目的において、腫瘍の治療方法は、腫瘍細胞成長の阻害、腫瘍細胞の殺傷および／または患者の生存日数の増加を達成するために、脳腫瘍細胞を本発明の化合物に接触させることを含む。本発明の方法による腫瘍の治療はまた、腫瘍細胞の接着および移動を阻害することによって、転移を阻害することも含む。

【0049】

本発明の細胞毒素化合物および接着／移動阻害化合物は哺乳動物での使用に好適である。ここで「哺乳動物」とは、乳腺から分泌される母乳によって子動物を栄養する高等脊椎動物の全てのクラス、例えば、ヒト、ウサギ、サル等を意味する。

アポトーシス

アポトーシス、すなわち計画された細胞死は、新たな蛋白質合成を必要とする活性プロセスである。そのプロセスは通常ATPを必要とし、新たなRNAおよび蛋白質合成に関連し、細胞のDNAを劣化させる内生エンドヌクレアーゼの活性化によって細胞ホモスタシスに必要な遺伝子テンプレートを破壊することで終

了する。アポトーシスは、細胞の制御された削除で、変態期、分化期および通常の細胞代謝回転において観察され、通常は受容体と結合した場合に制御されると思われる。このためアポトーシスは「プログラムされた細胞死」または「細胞の自殺」と呼ばれる。全ての細胞が自殺する遺伝子的プログラムを有している可能性があるが、通常はそれは抑制されている。通常の条件のもとでは、有機体にはもはや必要とされない細胞だけがこの自己破壊プログラムを活性化する。

【0050】

アポトーシス細胞死は、血漿膜小胞化、細胞容量の喪失、核凝縮、およびヌクレオソーム間隔でのDNAのエンドヌクレアーゼ減成を特徴とする。血漿膜のインテグリティーの喪失は、酸素圧低下や特定の毒素への曝露によって引き起こされたり、典型的には膜透過性および細胞破壊の増加による早期の事象であるネクロシスと呼ばれる細胞死の形態とは異なり、アポトーシスの比較的晩期の事象である。

接着／移動

接着とは、ラミン、フィブロネクチン、コラーゲンなどの細胞外マトリックス蛋白質に接着する腫瘍細胞等の細胞、例えば、腫瘍細胞の活動を意味する。接着アッセイは公知であり、本発明の目的においては、細胞外マトリックス蛋白質が塗布されたプレートへの腫瘍細胞の接着を含む。

【0051】

移動とは、腫瘍細胞が細胞外マトリックス蛋白質を通過して移動し、組織を侵襲する活動を意味する。移動のためのアッセイは、細胞がマトリゲル(MATRIGEL)マトリックス等の細胞外マトリックスによって作製されたマトリックスを介して移動する能力およびアクチン細胞骨格再配列等のその細胞の細胞骨格機構の評価、下記実施例に記載の局所的接着の変化を含む。

有用な用量

選択的に脳腫瘍細胞を殺傷するため、または脳腫瘍細胞の接着／移動を阻害するためにインビボで使用する場合、投与された量は望ましい効果、例えば、脳腫瘍を減少または削除するのに効果的な量、または腫瘍細胞の接着／移動を阻害するのに効果的な量である。その適切な量は、当業者が、実施例に記載したインビ

トロおよびインビボデータから公知の方法および関係式を用いて推定することができる。本願に含まれるS C I Dマウス薬理学的データを基礎として、効果的な曝露レベルを達成することができる。

【0052】

一般に、脳腫瘍細胞のアポトーシス、腫瘍の減少、および生存時間の増加を達成するために効果的な新規な置換キナゾリンの用量は、マイクロモル量、好ましくは100マイクロモル以上の化合物を細胞に与える。その必要用量は、標的部分に結合する化合物によって、例えば、好ましくは100ナノモル濃度以上に減少される。

【0053】

細胞の接着および移動阻害活性に対して、前記化合物は通常、100マイクロモル以下の低い用量で投与する。

【0054】

投与される効果的な用量は、それぞれの患者に特有の条件で変わるだろう。通常、薬物投与前の疾患の重さ、腫瘍の位置（曝露されているか、もしくは遠隔か）、宿主の年齢、代謝、病状等の要因によって薬物の効果の期待できる投与量が決まる。当該技術分野の当業者は、標準的な処置および患者分析によって、実施例に記載のデータから適切な用量を推定する。

【0055】

一般に、多少変化するが約1～100mg/kg体重を供給することが効果的である。

【0056】

さらに、本発明の組成物は他の抗腫瘍治療と組み合わせて投与される。そのような組み合わせの療法においては、ヒドロキシ置換キナゾリン誘導体の投与量は単一療法の場合より少ないだろう。

【0057】

【実施例】

本発明を以下の実施例によって更に説明する。それは、いくつかの好ましい実施形態を例示するものであり、本発明を限定するものではない。

実施例 1

キナゾリン誘導体の合成

全ての化学物質は、アルドリッチケミカル社、ミルウォーキー、ウィスコンシン州 (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin) から購入し、直接合成に用いた。アセトニトリル、メタノール、エタノール、エチルアセテート、テトラヒドロフラン、クロロホルム、メチレンクロリド等の無水溶媒は、密閉瓶で窒素の存在下でアルドリッチ社から入手し、カニューレ挿入によって反応器に移した。すべての反応は、窒素雰囲気で行った。

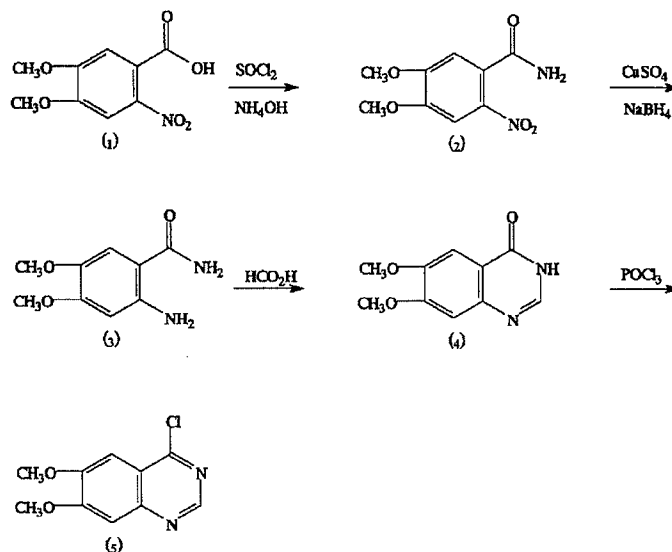
【0058】

重要な開始物質である 4-クロロ-6,7-ジメトキシキナゾリンは、下記スキーム 1 に概略を示したように、既知の方法で調製した (ノモトラ、ケミカルファーマスーティカルブレティン、1990、38:1591~1595); トーマス、シーエル、アカデミックプレス、ニューヨーク、ニューヨーク州、「I. キナゾリン誘導体の合成」)

【0059】

【化 4 2】

スキーム 1



【0060】

特に、4, 5'-ジメトキシ-2-ニトロ安息香酸（化合物1）を塩化チオニルで処理し、酸クロリドを作製し、続いてアンモニアと反応させ、4, 5'-ジメトキシ-2-ニトロベンザミド（化合物2）を作製した。触媒量の硫酸銅の存在下で、化合物2を水素化ホウ素ナトリウムを用いて還元し、4, 5'-ジメトキシ-2-アミノベンザミド（化合物3）を作製した。それをギ酸と共に直接還流し、6, 7'-ジメトキシキナゾリン-4（3H）-オン（化合物4）を作製した。化合物4をオキシ塩化リンと共に還流し、4-クロロ-6, 7'-ジメトキシキナゾリン（化合物5）を高収率で得た。

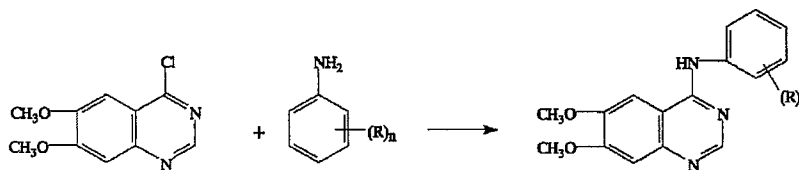
【0061】

置換キナゾリン誘導体を4-クロロ-6, 7'-ジメトキシキナゾリンと置換アニリンを下記スキーム2に概略を示したように縮合することによって調製した。

【0062】

【化43】

スキーム2



R = 置換基; n = 数

【0063】

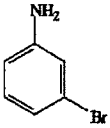
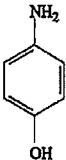
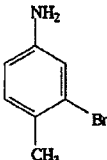
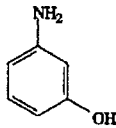
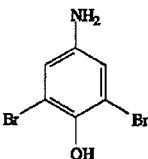
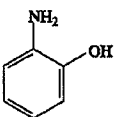
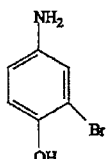
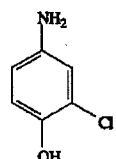
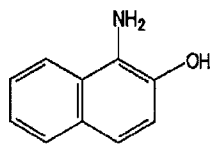
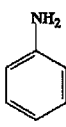
具体的に、EtOH（20ml）中4-クロロ-6, 7'-ジメトキシキナゾリン（448mg、2ミリモル）と置換アニリン（2.5ミリモル）との混合物を加熱し、還流した。4～24時間還流した後、過剰量のEt₃Nを添加し、前記溶媒を濃縮し、粗製生成物を得た。それをDMFから再結晶させた。

【0064】

上記のように、本発明の新規なキナゾリン誘導体を置換アニリン類を重要な開始物質4-クロロ-6, 7'-ジメトキシキナゾリンと反応させることによって作製した。前記化合物を合成するための各アニリンを下記表に示す。

【0065】

【表1】

WHI-P79を作る 	WHI-P131を作る 	WHI-P111を作る 	WHI-P180を作る 
WHI-P97を作る 	WHI-P132を作る 	WHI-P154を作る 	WHI-P197を作る 
WHI-P292を作る 			WHI-P258を作る 

【0066】

実施例2

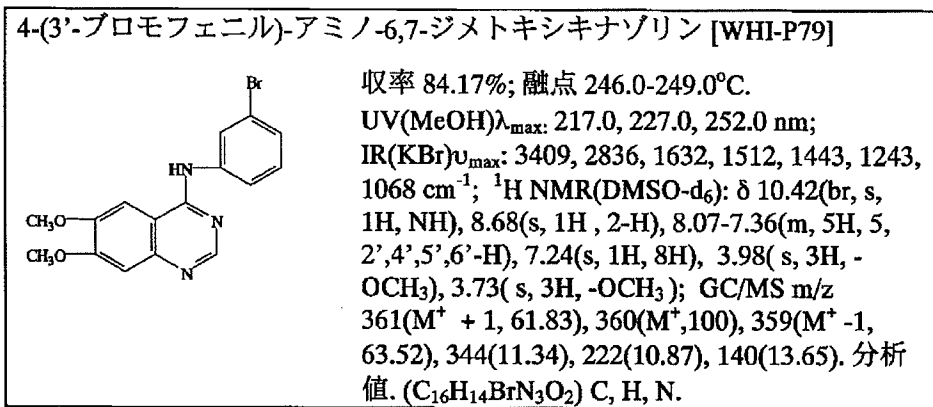
置換キナゾリン誘導体のキャラクタリゼーション

上記実施例1に記載のように、キナゾリン置換誘導体を合成し、さらにキャラクタリゼーションした。各構造をその同定分析試験結果とともに下に記す。プロトンおよび炭素核磁気共鳴値 (^1H および ^{13}C NMR) スペクトルは、マーキュリー2000バリアンスペクトロメータにより、それぞれ300MHzおよび75MHzで操作し、自動広帯域プローブを用いて記録した。特に記載のない限り、全てのNMRスペクトルを CDCl_3 中、常温で記録した。 ^1H 化学シフトは、内部標準0ppmとして用いられるテトラメチルシラン (TMS) からの低磁場移動の価を百万分率 (ppm単位のデルタ値) で記録した。また、s、d、t、q、mは、それぞれシングレット、ダブレット、トリプレット、カルテット、マルチプレットを表す。融点はフィッシャー ジョーンズ融点装置を用いて測定し

た(未補正值)。UVスペクトルは、ベックマンモデル#DU7400UV/Vスペクトロメータを用いて光路長1cmのセルで記録した。UVスペクトルの溶媒にはメタノールを使用した。フーリエ変換赤外線スペクトルは、エフティニコレットモデルプロテージ(FT-Nicolet model Protage)#460計測機器を用いて記録した。液体サンプルの赤外線スペクトルは、KBrディスクを用いてニート液(neat liquid)で測定した。全ての固形サンプルには、KBrペレット法を使用した。GC/マススペクトル分析は、マスイオン検出器とケムステーション(Chem station)ソフトウェアが備えられたヒューレットパッカード(Hewlett-Packard)GC/マススペクトロメータモデル#6890を用いて行った。オーブンの温度は70℃から250℃にゆっくり上昇させ、担体ガスにはヘリウムを使用した。

【0067】

【化44】

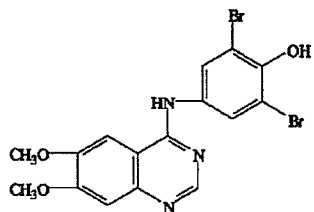


【0068】

【化45】

4-(3',5'-ジブromo-4'-ヒドロキシフェニル)-アミノ-6,7-ジメトキシキノザリン

[WHI-P97]



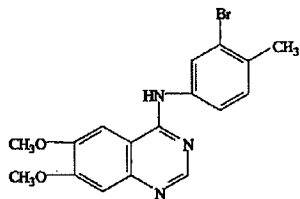
収率 72.80%; 融点 >300.0 °C. UV(MeOH) λ_{\max} : 208.0, 210.0, 245.0, 320.0 nm; IR(KBr) ν_{\max} : 3504(br), 3419, 2868, 1627, 1512, 1425, 1250, 1155 cm^{-1} ; ^1H NMR(DMSO- d_6): δ 9.71(s, 1H, -NH), 9.39(s, 1H, -OH), 8.48(s, 1H, 2-H), 8.07(s, 2H, 2', 6'-H), 7.76(s, 1H, 5-H), 7.17(s, 1H, 8-H), 3.94(s, 3H, -OCH₃), 3.91(s, 3H, -OCH₃). GC/MS m/z 456(M^+ +1, 54.40), 455(M^+ , 100.00), 454(M^+ -1, 78.01), 439(M^+ -OH, 7.96), 376(M^+ +1 - Br, 9.76), 375(M^+ -Br, 10.91), 360(5.23). 分析値 (C₁₆H₁₃Br₂N₃O₃) C, H, N.

【0069】

【化46】

4-(3'-ブromo-4'-メチルフェニル)-アミノ-6,7-ジメトキシキノザリン [WHI-

P111]

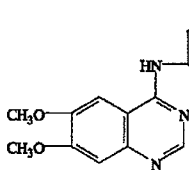


収率 82.22 %; 融点 225.0-228°C. ^1H NMR(DMSO- d_6): δ 10.23(s, 1H, -NH), 8.62(s, 1H, 2-H), 8.06(D, 1H, $j_{2',6'}=2.1$ Hz, 2'-H), 7.89(s, 1H, 5-H), 7.71(dd, 1H, $J_{5',6'}=8.7$ Hz, $J_{2',6'}=2.1$ Hz, 6'-H), 7.37(d, 1H, $J_{5',6'}=8.7$ Hz, 5'-H), 7.21(s, 1H, 8-H), 3.96(s, 3H, -OCH₃), 3.93(s, -OCH₃). UV(MeOH) $\lambda_{\max}(\epsilon)$: 204.0, 228.0, 255.0, 320.0 nm. IR(KBr) ν_{\max} : 3431, 3248, 2835, 1633, 1517, 1441, 1281, 1155 cm^{-1} . GC/MS m/z 375(M^+ +1, 76.76), 374(M^+ , 100.00), 373(M^+ -1, 76.91), 358(M^+ +1 - OH, 11.15), 357(1.42), 356(6.31). 分析値 (C₁₇H₁₆BrN₃O₂HCl) C, H, N.

【0070】

【化47】

4-(4'-ヒドロキシルフェニル)-アミノ-6,7-ジメトキシキノザリン [WHI-P131]



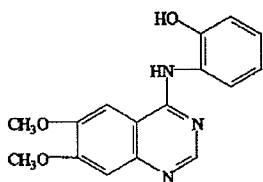
収率 84.29%; 融点 245.0-248.0 °C.

UV(MeOH) λ_{\max} : 203.0, 222.0, 251.0, 320.0 nm;
IR(KBr) ν_{\max} : 3428, 2836, 1635, 1516, 1443, 1234
 cm^{-1} ; ^1H NMR(DMSO- d_6): δ 11.21(s, 1H, -NH),
9.70(s, 1H, -OH), 8.74(s, 1H, 2-H), 8.22(s, 1H, 5-
H), 7.40(d, 2H, $J = 8.9$ Hz, 2',6'-H), 7.29(s, 1H, 8-
H), 6.85(d, 2H, $J = 8.9$ Hz, 3',5'-H), 3.98(s, 3H, -
OCH₃), 3.97(s, 3H, -OCH₃). GC/MS m/z 298 (M^+
+1, 100.00), 297(M^+ , 26.56), 296(M^+ -1, 12.46). 分
析値 ($\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3\text{HCl}$) C, H, N.

【0071】

【化48】

4-(2'-ヒドロキシルフェニ)-アミノ-6,7-ジメトキシキノザリン [WHI-P132]

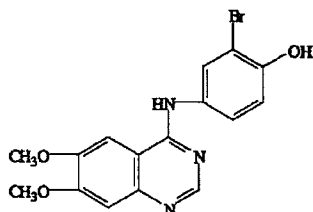


収率 82.49%; 融点 255.0-258.0 °C. ^1H
NMR(DMSO- d_6): δ 9.78(s, 1H, -NH), 9.29(s, 1H, -
OH), 8.33(s, 1H, 2-H), 7.85(s, 1H, 5-H), 7.41-
6.83(m, 4H, 3', 4', 5', 6'-H), 7.16(s, 1H, 8-H),
3.93(s, 3H, -OCH₃), 3.92(s, 3H, -OCH₃).
UV(mEoh) $\lambda_{\max}(\epsilon)$: 203.0, 224.0, 245.0, 335.0 nm.
IR(KBr) ν_{\max} : 3500 (br), 3425, 2833, 1625, 1512,
1456, 1251, 1068 cm^{-1} . GC/MS m/z 298(M^+ +1,
8.91), 297(M^+ , 56.64), 281(M^+ +1- OH, 23.47),
280(M^+ - OH, 100.00). 分析値 ($\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3\text{HCl}$)
C, H, N.

【0072】

【化49】

4-(3'-ブromo-4'-ヒドロキシルフェニル)-アミノ-6,7-ジメトキシキノザリン [WHI-P154]



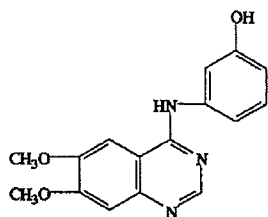
収率 89.90%; 融点 233.0-233.5 °C.

UV(MeOH) λ_{\max} : 203.0, 222.0, 250.0, 335.0 nm;
IR(KBr) ν_{\max} : 3431 br, 2841, 1624, 1498, 1423, 1244 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}(\text{DMSO}-d_6)$: δ 10.08(s, 1H, -NH), 9.38(s, 1H, -OH), 8.40(s, 1H, 2-H), 7.89(d, 1H, $J_{2',5'} = 2.7\text{Hz}$, 2'-H), 7.75(s, 1H, 5-H), 7.55(dd, 1H, $J_{5',6'} = 9.0\text{Hz}$, $J_{2',6'} = 2.7\text{Hz}$, 6'-H), 7.14(s, 1H, 8-H), 6.97(d, 1H, $J_{5',6'} = 9.0\text{Hz}$, 5'-H), 3.92(s, 3H, -OCH₃), 3.90(s, 3H, -OCH₃).
GC/MS m/z 378($M^+ + 2$, 90.68), 377($M^+ + 1$, 37.49), 376(M^+ , 100.00), 360(M^+ , 3.63), 298(18.86), 282 (6.65). 分析値 ($\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_3\text{HCl}$) C, H, N.

【0073】

【化50】

4-(3'-ヒドロキシルフェニル)-アミノ-6,7-ジメトキシキノザリン [WHI-P180]



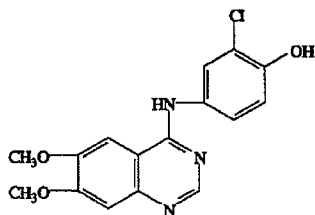
収率 71.55 %; 融点 256.0- 258.0 °C.

$^1\text{HNMR}(\text{DMSO}-d_6)$: δ 9.41(s, 1H, -NH), 9.36(s, 1H, -OH), 8.46(s, 1H, 2-H), 7.84(s, 1H, 5-H), 7.84-6.50(m, 4H, 2', 4', 5', 6' -H), 7.20(s, 1H, 8-H), 3.96(s, 3H, -OCH₃), 3.93(s, 3H, -OCH₃).
UV(MeOH) $\lambda_{\max}(\epsilon)$: 204.0, 224.0, 252.0, 335.0 nm.
IR(KBr) ν_{\max} : 3394, 2836, 1626, 1508, 1429, 1251 cm^{-1} . GM/MS m/z : 297(M^+ , 61.89), 296(M^+ , 61.89), 296($M^+ - 1$, 100.00), 280($M^+ - \text{OH}$, 13.63).
分析値 ($\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3\cdot\text{HCl}$) C, H, N.

【0074】

【化51】

4-(3'-クロロ-4'-ヒドロキシルフェニル)-アミノ-6,7-ジメトキシキナゾリン [WHI-P197]

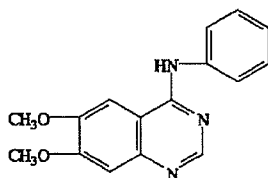


収率 84.14%; 融点 245.0°C(dec). ^1H NMR(DMSO- d_6): δ 10.00(s, 1H, -NH), 9.37(s, 1H, -OH), 8.41(s, 1H, 2-H), 7.78(s, 1H, 5-H), 7.49(d, 1H, $J_{2',6'}=2.7$ Hz, 2'-H), 7.55(dd, 1H, $J_{5,6}=9.0$ Hz, $J_{2',6'}=2.7$ Hz, 6'-H), 7.16(s, 1H, 8-H), 6.97(d, 1H, $J_{5',6'}=9.0$ Hz, 5'-H), 3.93(s, 3H, -OCH₃), 3.91(s, 3H, -OCH₃). UV(MeOH) $\lambda_{\text{max}}(\epsilon)$: 209.0, 224.0, 249.0, 330.0 nm. IR(KBr) ν_{max} : 3448, 2842, 1623, 1506, 1423, 1241 cm^{-1} . GC/MS m/z : 341(M^+ , 100.00), 326($M^+-\text{CH}_3$, 98.50), 310($M^+-\text{OCH}_3$, 12.5), 295(9.0), 189(13.5), 155(13.8). 分析値 ($\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{ClN}_3\text{O}_3 \cdot \text{HCl}$) C, H, N.

【0075】

【化52】

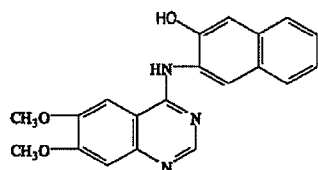
4-(フェニル)-アミノ-6,7-ジメトキシキナゾリン [WHI-P258]



収率 88.6%; 融点 258.0-260.0 °C. ^1H NMR(DMSO- d_6): δ 11.41(s, 1H, -NH), 8.82(s, 1H, 2-H), 8.32(s, 1H, 5-H), 7.70-7.33(m, 5H, 2', 3', 4', 5', 6'-H), 7.36(s, 1H, 8H), 4.02(s, 3H, -OCH₃), 4.00(s, 3H, -OCH₃), 4.00(s, 3H, -OCH₃). UV(MeOH) $\lambda_{\text{max}}(\epsilon)$: 210.0, 234.0, 330.0 nm. IR(KBr) ν_{max} : 2852, 1627, 1509, 1434, 1248 cm^{-1} . GC/MS m/z 282(M^++1 , 10.50), 281(M^+ , 55.00), 280(M^+-1 , 100.00), 264(16.00), 207(8.50). 分析値 ($\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$) C, H, N.

【0076】

【化53】

4-(2'-ヒドロキシ-ナフチル-**3'-アミノ-6,7-ジメトキシキ****ナゾリン[WHI-P292]**

収率 87.41%; 融点 277.0-279.0°C, IR(KBr) ν_{max} : 3479, 3386, 3036, 2901, 1632, 1581, 1504, 1437, 1281 cm^{-1} . ^1H NMR(DMSO- d_6): δ 11.38(s, 1H, -NH), 10.35(s, 1H, -OH), 8.73(s, 1H, 2-H), 8.25(s, 1H, 5-H), 7.93-7.30(m, 6H, 1', 4', 5', 6', 7', 8'-H), 7.37(s, 1H, 8H), 4.00(s, 6H, -OCH₃). GC/MS m/a: 281(41.0), 253(11.0), 207(100.0). 分析値 (C₂₀H₁₇N₃O₃·HCl) C, H, N.

【0077】

実施例3

置換キナゾリン誘導体の細胞毒性

置換キナゾリン誘導体化合物のヒト膠芽腫に対する細胞毒性を評価した。また化合物上の特定の置換基の重要性の比較を調べた。実施例1に記載の方法で調製した置換キナゾリン誘導体化合物を対照としてのDMSOおよびゲニステインとともに試験した。

細胞毒性アッセイ

様々な化合物のヒト脳腫瘍細胞ラインに対する細胞毒性アッセイをMTT (3-[4, 5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2, 5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド) アッセイ (ベーリンガー・マンハイム社(Boehringer Mannheim Corp.)、インディアナポリス、インディアナ州) を用いて行った。簡単に言うと、指数関数的に成長する脳腫瘍細胞を96-ウェルプレートに 2.5×10^4 個/ウェルの濃度でシードし、薬物に曝露する前に37°Cで36時間インキュベーションした。処理の日、培養培地をウェルから注意深く吸引し、キナゾリン化合物WHI-P79、WHI-P97、WHI-P111、WHI-P131、WHI-P132、WHI-P154、WHI-P180、WHI-P197およびWHI-P258、非複合EGFまたはEGF-P154ならびにチロシンキナーゼ阻害イソフラボンゲニステイン (GEN) を0.1~250 μM の濃度で含む新鮮な培地と置換した。各処理では、3つの同じウェルを使用した。

【0078】

ヒト膠芽腫細胞ラインU373をアメリカンタイプカルチャーコレクション (American Type Culture Collection) (ロックビル、メリーランド州(Rockville、MD)) から入手し、10%ウシ胎児血清および抗生物質を添加したダルベッコ修正イーグル培地(Dulbecco's modified Eagle's medium)中に連続的細胞ラインとして培養した。Bリネージ急性リンパ芽球性白血病細胞ライン、NALm-6を陰性対照として使用した。

【0079】

前記細胞を様々な化合物とともに、37℃で24～36時間、加湿5%二酸化炭素雰囲気中でインキュベーションした。各ウェルに対して、10 μ lのMTT (最終濃度0.5mg/ml) を添加し、プレートを37℃で4時間インキュベーションし、MTTを変形活性細胞と反応させてホルマザンの結晶を作製した。前記ホルマザン結晶を、0.01M 塩酸中10%SDSを含有する溶液中に37℃で一晩溶解させた。それぞれのウェルの吸収度をマクロプレート読取装置 (ラボシステム (LabSystems)) で540nmで、基準波長690nmで測定した。OD₅₄₀ 値を各ウェル中の生存細胞数に換算するために、前記OD₅₄₀ 値を、それぞれの細胞ラインから生成した標準OD₅₄₀ 対細胞数曲線上の値と比較した。生存率は下記式によって計算した。

$$\text{生存率 (\%)} = \text{生存細胞数 (試験)} / \text{生存細胞数 (対照)} \times 100$$

IC50値は、非線形回帰分析によって計算した。

アポトーシスのインサイチュ検出

アポトーシスの実地実験を、アポプタッグ (Apop Tag) インサイチュ検出キット (オンカー、ガイザーバーグ、メリーランド州 (Oncor, Gaithersburg, MD)) を用いて製造元の指示にしたがって、インサイチュニックエンド標識法によって行った。指数関数的に成長する細胞を6ウェル組織培養プレートに50 \times 10⁴ 個/ウェルの濃度でシードし、薬物に曝露する前に37℃で36時間、加湿5%二酸化炭素雰囲気中でインキュベーションした。その上澄み培溶液を注意深く吸引し、10、25または50 μ g/mlの濃度で非複合EGFまたはEGF- α 154を含む新鮮な培地と置換した。加湿5%二酸化炭素インキュベーター

内で、37℃で36時間インキュベーションした後、上澄みを注意深く吸引し、その細胞を1～2分、0.1%トリプシン処理した。検出した細胞を集め、15 ml 遠心分離管中に集め、媒体を用いて洗浄し、1000 rpmで5分間遠心分離を行ってペレット化した。細胞を50 μ l のPBS中に再び懸濁させ、ポリ-L-リジンを塗布したカバーガラスに移し、15分間付着させた。その細胞をPBSで1度洗浄し、均衡化緩衝液を用いて10分間常温でインキュベーションした。

【0080】

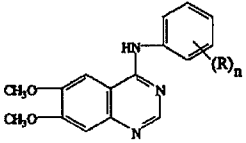
均衡化緩衝液を除去した後、細胞を末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) および断片化された核DNAの曝露された3'-ヒドロキシ末端を標識するためのジゴキシゲニン-11-UTPを含有する反応混合物とともに37℃で1時間インキュベーションした。その細胞をPBSで洗浄し、FITCと結合した抗ジゴキシゲニン抗体とともに常温で1時間インキュベーションし、組み込まれたdUTPを検出した。PBSで前記細胞を洗浄した後、そのカバーガラスをプロピジウムヨードを含有するベクタシールド (Vectashield) (ベクターラボス、バーリングゲーム (Vector Labs, Burlingame) カリフォルニア州) を含むスライドの上におき、共焦レーザ走査顕微鏡を用いて観察した。非アポトーシス細胞は曝露された3'-ヒドロキシル末端を欠くため、有意な量のdUTPを組み込んでいなかった。その結果、多量の曝露された3'-ヒドロキシル末端を有するアポトーシス細胞よりもはるかに蛍光光度が小さかった。対照反応では、TdT酵素を反応混合物から除去した。

結果

各アニリン部分の上の特異的置換基のアイデンティティを下記にまとめる。

【0081】

【化54】

キナゾリン誘導体	置換基のアイデンティティ
	WHI-P79 3-Br
	WHI-P97 3-Br, 5-Br, 4-OH
	WHI-P111 3-Br, 4-CH ₃
	WHI-P131 4-OH
	WHI-P132 2-OH
	WHI-P154 3-Br, 4-OH
	WHI-P180 3-OH
	WHI-P197 3-Cl, 4-OH
	WHI-258 H
	WHI-292 1-OH ナフチル

【0082】

脳腫瘍細胞に対する細胞毒素アッセイの結果を図1Aおよび1Bに示す。要約すると、フェニル環上にヒドロキシ置換基を持つこれらの化合物は、脳腫瘍細胞を殺傷するのに効果的である。置換基を持たない化合物P258および3-Br-置換された強力なTKインヒビターP79は、脳腫瘍細胞を殺傷するのに効果的でなかった。ゲニステインおよびDMSO対照も効果的でなかった。

【0083】

アニリン部分にヒドロキシル基を有する置換キナゾリン誘導体は細胞毒素活性を持つことが証明された。4つの試験化合物は単一のヒドロキシル基を、4位(WHI-P131)、2位(WHI-P132)、3位(WHI-P180)および1位(WHI-P292)にそれぞれ持っていた。4つの全ては、有意な細胞毒性を有しており、WHI-P180(3-OH)化合物が他の2つより僅かに強かった。

【0084】

化合物はヒドロキシル置換基およびハロゲン置換基の両方を持つ化合物もまた、強力な細胞毒物質であった。WHI-P197(3-Cl, 4-OH)の構造とWHI-P131(4-OH)の構造とは、3位の塩素原子のみが異なる。図1Aおよび1Bからわかるように、塩素原子が添加されても、この化合物の細胞毒性は影響を受けなかった。

【0085】

WHI-P154(3-Br, 4-OH)の構造とWHI-P131(4-OH)

H) の構造とは、3位の臭素原子のみが異なる。図1 Aおよび1 Bからわかるように、臭素原子が添加されると、この化合物の細胞毒性は顕著に増加した。

【0086】

WHI-P97の構造とWHI-P154の構造とは、5位の追加的ブロミン原子のみが異なる。図1からわかるように、追加された第2のブロミン原子は実質的な効果を持たない。

【0087】

WHI-P154、4-(3'-ブromo-4'-ヒドロキシルフェニル)-アミノ-6,7-ジメトキシキナゾリンは、3つの別個の実験の全てにおいて、平均(±SE) IC50値167.4±26.9 μMおよび複合物生存曲線 IC50値158.5 μMを示し、U373ヒト膠芽腫細胞ラインに対して有意な細胞毒性を示した。対照的に、WHI-P79、EGF-Rの強力なインヒビターおよびSrcファミリーチロシンキナーゼ(ボスら、クリニカルカンサーリサーチ(Bos, et al., Clin. Cancer Res.)1997, 3:2099~2106; フライら、サイエンス(ワシントンDC)(Fry, et al., Science (Washington, D.C.))1994, 265:1093~1095)では、U373膠芽腫細胞に対する細胞毒性を検出されなかった。したがって、WHI-P154のU373細胞に対する細胞毒性は、チロシンキナーゼ阻害特性によっては説明がつかない。この考えはさらに、PTKインヒビターゲニステイン(対照として含有)ではU373に対する検出可能な細胞毒性を発現できない(IC50値>250 μM; 図1 A)ことによっても裏付けられた。

実施例4

複合WHI-P154のヒト膠芽腫細胞に対する細胞毒性の向上

正常膠細胞および神経とは対照的に、有意な数の膠芽腫細胞がEGF受容体(EGF-R)を高レベルで発現した。したがって、EGF-Rは細胞毒素物質を膠芽腫細胞に効率よく運ぶための強力な標的である(メンデルソン ジェーおよびバセルガ ジェー(Mendelsohn, J. and Baselga, J.))、1995、バイオロジカルセラピーオフキャンサー：論理と実践(Biologic Therapy of Cancer: Principles and Practice)、pp. 607~23)。

膠芽腫細胞によるEGF-Rの発現

EGF-RのU373およびU87ヒト膠芽腫細胞ライン（実施例3に記載のように入手し、保持した）上への表面発現を、EGF-Rの細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体を用いた免疫蛍光法および共焦レーザー走査顕微鏡検査によって確認した。抗- α -チューブリン抗体および核染色物質トートー3で染色する免疫蛍光染色法を共焦レーザー走査顕微鏡検査と組み合わせて用いて、非複合EGFまたはEGF-P154のいずれかで処理したU373膠細胞の形態学的性質を調べた。細胞をパラホルムアルデヒド中に固定し、EGF-Rのモノクローナル抗体（緑色蛍光）で免疫染色し、トートー3（青色蛍光）で対比染色した。免疫染色した細胞をレーザー共焦走査顕微鏡を用いて分析した。青色蛍光色は核を示す。双方の細胞ラインは、抗EGF-R抗体との分散顆粒状免疫反応物を示す（図2Aおよび2B）。

EGF-P154複合体の調製

4-（3'-ブromo-4'-ヒドロキシルフェニル）-アミノ-6,7-ジメトキシキナゾリン（WHI-P154）の膠芽腫細胞に対する証明された抗腫瘍抗体活性を高める試みの中で、膠芽腫細胞による標的化および細胞吸収を向上させることによって、下記の方法でその化合物を組換えヒトEGFと結合させた。

【0088】

組換えヒトEGF（rhEGF）を、N末端が最適な蛋白質発現および折りたたみのためのヘキサペプチドリーダーシーケンスと融着しているヒトEGF合成遺伝子を含む遺伝子操作されたプラスミドを持つ大腸菌中に作製した。含有体および成熟した蛋白質の形状に析出させた前記rhEGF融着蛋白質をトリプシン分裂によって回復し、続いてイオン交換クロマトグラフィーおよびHPLCを用いて精製した。回復したrhEGFは、逆相HPLCおよび等電点4.6±0.2のSDS-PAGEによって純度99%であった。内毒素レベルは0.172 EU/mgであった。

【0089】

最近発表された、ヘテロ二官能光反応性架橋物質、スルフォスクシンイミジル6-[4'アジド-2'-ニトロフェニルアミノ]ヘキサノエート（スルフォーS

ANPAH) (ピアスケミカル社、ロックフォード、イリノイ州(Pierce Chemical Co., Rockford, IL)) を用いた光化学的縮合方法をEGF-P154複合体を合成するために使用した(ウッケンら(Uckun et al.)、サイエンス、1995、267、886~891)。スルフォSANPAH修飾rhEGFを10:1のモル比でWHI-P154[ジメチルスルホキシド(DMSO)中50mM溶液]と混合し、多帯域UV光エミッター(モデルUVGL-15ミネアライト:UVP、サンガブリエル、カリフォルニア州(Model UVGL-15 Mineralight; UVP, San Gabriel, CA))を用いて、10分間穏やかに混合しながら、波長254~366nmでUV照射した。反応性シングレットニトレンをEGF-SANPAHの他の末端に光分解生成させ、10倍モルを超えるWHI-P154の存在下でWHI-P154をEGFに付着させた。

【0090】

反応混合物中の過剰なWHI-P154を、予備包装したPD-10カラムを通過させ、複合したWHI-P154ならびに高分子量の反応生成物を有するもしくは有さない12kDa EGF-EGFホモ複合体を、サイズ排除高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)によって除去した。EGF-P154のEGF-SANPAHからの分離には、ヒューレットパッカード(HP)1100シリーズHPLC機器を用いた逆相HPLCを使用した。最終精製後、分析HPLCは、スフェリソープ(Spherisorb)ODS-2逆相カラムを用いて行った(250×4 mm、ヒューレットパッカード社、カタログ#79992402-584)。HPLCを行う前に、ベックマンDU7400分光光度計を用いて、各サンプルのUVスペクトルを生成し、EGF-P154、EGF-SANPAHおよび非修正EGFのλ最大値を確認した。

【0091】

クロマトグラムの個別のピークの最適検出を確実にを行う装置を備えた、複数波長検出オプションを用いて、214、265および480nmの波長で、各HPLCクロマトグラムを連続的に行った。0~30分の時間間隔で0%~100%溶離液の勾配フローで分析を行った。上記コラムに塗布した5μLのサンプルについて下記勾配プログラムを用いて行った。0~5分、0~20%溶離液; 5~2

0分、20～100%溶離液；25～30分、100%溶離液；および30～35分、100～0%溶離液。前記溶離液は80%アセトニトリル（CH₃CN）、20%水および0.1%TFAの混合物であった。エレクトロスプレー電離マスペクトロメトリー（フェングら（Feng et al.）、ジャーナルアメリカンソサエティー マスペクトロメトリー（J. Am. Soc. Mass Spectrometry）1991、2:387～401）；コベイら（Covey, et al.）、1988、ラピッドコミュニケーションインマスペクトロメトリー（Rapid Communications in Mass Spectrometry）2:249～256）を、PESCI FX API 3倍4倍マスペクトロメータ（ノーウォーク（Norwalk）、CT）を用いて行い、P154およびEGF-P154中のP154およびEGFの化学量論を測定した。

EGF-P154の取り込みおよび内部移行

内部移行したEGF-RおよびEGF-P154分子ならびに処理した細胞の形態学的変化を追跡調査するために、EGF-P154複合体のU373膠芽腫細胞中での取り込みのカイネティクスおよび細胞毒性を免疫蛍光法および共焦レーザーマイクロコピーを用いて分析した。

【0092】

(i) EGF受容体（EGF-R）の脳腫瘍細胞への表面発現を調べ、(ii) 脳腫瘍細胞によるEGF-P154の取り込みを評価し、(iii) EGF-P154処理した脳腫瘍細胞の形態学的特徴を調べるために免疫蛍光法を用いた。EGF-R発現およびEGF-P154の細胞取り込みの分析のために、U87およびU373膠芽腫細胞をポリ-L-リジンを塗布したガラス底35mmペトリ皿（マテック社、アシュランド、マサチューセッツ州（Mattek Corp. Ashland MA））に載せ、48時間維持した。吸収の研究では、培養培地を、5 μg/mlのEGF、EGF-P154もしくは非複合体WHI-P154を含む新鮮な培地と置換し、細胞を37℃で5分、10分、15分、30分、60分および24時間インキュベーションした。

【0093】

インキュベーションの終わりに、細胞をPBSで2回洗浄し、2%パラホルムアルデヒドに固定した。前記細胞を透過性とし（permeabilized）、非特異結合

部位を0.1%トリトンX-100を含有するPBS中に2.5%BSAで30分ブロックした。EGF-R/EGF-P154複合体を検出するために、細胞をヒトEGF-Rの細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体(BSAおよびトリトンX-100を含有するPBS中に1:10で希釈)(サンタクルツバイオテクノロジーインク、サンタクルツ、カリフォルニア(Santa Cruz Biotechnologies Inc., Santa Cruz, CA))およびポリクローナルウサギ抗P154抗体(1:500希釈)の混合物を用いて、常温で1時間インキュベーションした。PBSですすいだ後、細胞を、FITCと結合したヤギ抗マウスIgG抗体(アマーシャム社、アーリントンハイツ(Amersham Corp., Arlington Heights)、イリノイ州)およびテキサスレッドとPBS中1:40希釈で結合したロバ抗ウサギIgG(アマーシャム社)の混合物を用いて1時間インキュベーションした。同様に、1:1000で希釈したアルファチューブリン(シグマケミカル社(Sigma Chemical Co.))、セントルイス、ミズーリ州)に対するモノクローナル抗体と、FITCと結合した抗マウスIgGを用いた免疫蛍光法によってチューブリン発現を調べた。細胞をPBS中で洗浄し、トートー3(モレキュラプローブインク、ユージン(Morecular Probes Inc., Eugene)、オレゴン州)を用いて、1:1000の希釈で10分間対比染色した。細胞をPBSで再び洗浄し、カバーガラスをベクタシールド(ベクターラボ、バーリンガム、カリフォルニア州)におき、ニコンラボフトラップライト顕微鏡(Nikon Labphoto upright microscope)を備えた共焦顕微鏡(バイオラッド(Bio-Rad)、MRC1024)を用いて観察した。

細胞毒素活性

WHI-P154の膠芽腫細胞への送達EGFとの複合により改善され、抗腫瘍活性を強めたかどうかを調べるために、EGF-P154および非複合体WHI-P154のU373およびU87ヒト膠芽腫細胞ラインに対する細胞毒性を実施例3に記載の方法で、インビトロMTTアッセイを用いた用量反応試験によって分析した。実施例3に記載のように、ニックエンド標識アッセイによってアポトーシスも評価した。そのデータを下記に記す。

結果

EGF-RのU373およびU87ヒト膠芽腫細胞ラインに対する表面発現を、EGF-Rの細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体を用いて免疫蛍光法および共焦レーザー走査マイクロスコープによって確認した。図2Aおよび2Bに示したように、両細胞ラインとも、抗-EGF-R抗体を伴う分散性顆粒性免疫反応を示した。

【0094】

EGF-P154複合体のU373膠芽腫細胞における取り込みと細胞毒性のカイネティクスを免疫蛍光法および共焦レーザーマイクロスコープを用いて分析し、EGF-RおよびEGF-P154分子の内部移行ならびに処理された細胞の形態学的変化を追跡した。非複合EGF（図示せず）と同様に、EGF-P154は、EGF-R分子の内部移行を誘発することによって、受容体媒介細胞内組み込みを介して標的膠芽腫細胞と結合し、入ることができた。図3A-C、3C'、3Dおよび3D'に示すように、処理された細胞の細胞質内でのEGF-P154（抗-EGF-R抗体、赤色蛍光により検出）およびEGF-R（抗EGF-R抗体、緑色蛍光によって検出）の共局在化によって測定されるように、EGF-P154曝露10分以内に、EGF-R/EGF-P154複合体は内部移行し始めた。30分で、内部移行したEGF-R/EGF-P154複合体を、処理した膠芽腫細胞の核周囲の領域に検出した。対照的に、非複合体WHI-P154のみで処理した細胞（図3B、3B'）では、表面EGF-Rまたは抗P154抗体（赤色蛍光）で染色された細胞で再分散が検出されなかった。24時間までで（6または12時間ではない）、WHI-154分子は、非複合WHI-154で処理された細胞内に検出することができた（図4A、4A'、4B、4B'）。したがって、WHI-P154とEGFとの結合によってEGF-R陽性膠芽腫細胞によるこの細胞毒性キナゾリン誘導体の取り込みが増加した。

【0095】

WHI-P154の膠芽腫細胞への送達EGFとの結合により改善され、抗腫瘍活性を強めたかどうかを調べるために、EGF-P154および非複合体WHI-P154のU373およびU87ヒト膠芽腫細胞ラインに対する細胞毒性を実施例3に記載の方法で、インビトロMTTアッセイを用いた用量反応試験に

よって分析した。図5Aに示すように、EGF-P154はこれらの膠芽腫細胞を3つの個別の実験のそれぞれにおいて、ナノモル濃度で、U373細胞については平均IC50値 813 ± 139 nM (範囲588~950 nM) で、U87細胞については平均IC50値 620 ± 97 nM (範囲487~761 nM) で殺傷した。前記複合体の細胞生存曲線から求めたIC50値は、U373細胞に対して881 nM、U87細胞に対して601 nMであった。比較して、非複合体WHI-P154は、U373またはU87細胞をマイクロモル濃度でしか殺傷しなかった。EGF-P154は、U373細胞に対しては非複合体WHI-P154の206倍 (IC50値： 167.4 ± 26.9 μ M対 811 ± 139 μ M、 $P < 0.003$)、またU87細胞に対しては非複合体WHI-P154の288倍 (IC50値： 178.62 ± 18.46 μ M対 620 ± 97 μ M、 $P < 0.001$) 強力であった (図5A)。

【0096】

EGF-R陰性NALM-6白血病細胞に対して著明な細胞毒性を示すWHI-P154とは異なり、EGF-P154は、EGF-R陽性膠芽腫細胞ラインのみに選択的細胞毒性を引き起こした (図5Aおよび5B)。したがって、EGFとの結合によってWHI-P154のヒト膠芽腫に対する効力は上昇し、同時にEGF-R陽性標的に対する細胞毒性は制限された。

【0097】

EGF-P154複合体とは異なり、EGF-Rチロシンキナーゼの強力なインヒビターであり、SrcファミリーPTKと結合したEGF-RであるEGF-GENは、膠芽腫細胞を殺傷することができなかった (図5A)。したがって、EGF-P154の強力な細胞毒性は、WHI-P154部分のチロシンキナーゼ阻害特性によるものではない。

【0098】

抗-アルファ-チューブリン抗体および核染色トートー3によって染色を行う免疫蛍光法を、共焦レーザー走査マイクロスコープと組み合わせて用い、非複合体であるEGFまたはEGF-P154のいずれかで処理したU373神経膠腫細胞の形態学的特徴を調べた。図6A~6Cに示したように、 25μ g/mlの

E G F - P 1 5 4 (25 μ g/ml の非複合体 E G F ではない) に曝露 24 時間後、神経膠腫細胞のほとんどは、完全に微小管が完全に壊れ、顕著に収縮し、核が断片化し、基質に接着できない異常な構造を示した。E G F - P 1 5 4 処理された神経膠腫細胞はアポトーシスに一致していた。

【0099】

E G F - P 1 5 4 処理された膠芽腫細胞の中の D N A アポトーシスによる断片化を確認するために、断片化された D N A 中の曝露された 3' - ヒドロキシル基を T d T 媒介性 d U T P ニックエンド標識によって検出させるインサイチュアポトーシスアッセイを行った。図 6 D および 6 E に示された共焦レーザ走査マイクロコピー画像に示されているように、E G F - P 1 5 4 処理した (しかし E G F 処理していない) 神経膠腫細胞について F I T C - 結合抗ジゴキシゲニン (緑色蛍光) およびヨウ化プロピジウム対比染色法 (赤色蛍光) を用いたジゴキシゲニン - d U T P 組込みを調べたところ、処理 36 時間後、緑と赤の蛍光が重なった多くのアポトーシス黄色核が認められた。

【0100】

要約すると、これらのデータは、E G F との結合によって脳腫瘍細胞を標的としたとき、脳腫瘍細胞 P 1 5 4 細胞毒素活性が特異的になり、かつ上昇することを示した。

実施例 5

S C I D マウスモデルでの E G F - P 1 5 4 の抗腫瘍活性

S C I D マウスモデルにおいて、複合 E G F - P 1 5 4 のインビボでの抗腫瘍活性が示された。C B. 17 S C I D マウスにおいて、 0.5×10^6 の U 3 7 3 細胞を皮下注射しところ、腫瘍が急速に発生した。多様なヒト膠芽腫に対するこの S C I D マウス異種移植モデルでの E G F - P 1 5 4 のインビボ抗腫瘍活性を調べた。

S C I D マウスコロニーの維持

S C I D マウスを、温度、湿度、騒音レベルが制御された確実な室内施設に位置づけられた特定の病原菌を含まない部屋に収容した。その S C I D マウスを、げっ歯類用食物を備えた、オートクレーブしたマイクロアイソレータケージに入

れた。水も一緒にオートクレーブし、トリメトプリム／スルフォメトキサゾールを3日／週補充した。

ヒト膠芽腫のSCIDマウス異種移植モデル

CB. 17 SCIDマウスの右後足に、0.2 mL PBS中 0.5×10^6 U373ヒト膠芽腫細胞を皮下注射によって接種した。脳腫瘍細胞を免疫追加されたSCIDマウスを、i.p.用量のEGF-P154(0.2 mL PBS中0.5 mg/kg/投与量、もしくは1 mg/kg/投与量)で、膠芽腫細胞の接種の翌日から始めて10日間毎日処理した。PBS、非複合EGF(1 mg/kg/投与量)、および非複合WHI-P154(1 mg/kg/投与量)により毎日処理したものを対照として用いた。マウスの健康状態、腫瘍の成長を毎日観察し、3ヶ月観察後、瀕死状態になり、節食や摂水ができなくなるほど腫瘍が成長した時に屠殺した。腫瘍はヴァニアカリパーを用いて週に2回測定し、腫瘍の大きさを次式(フリードマン、エス、エイチ、エムドーラン、エム、イー、ペッグ、エイイー、マセリ エス、ケア エス、カチノ ジェー ジェー、ビンガー ディー ディー、ショールド エス シー ジュニア(Friedman, S.H., mDolan, M.E., Pegg, A.E., Marcelli, S., Keir, S., Catino, J.J., Binger, D.D., Schold, S.C., Jr)、1995、*キャンサーリサーチ*、55:2853~2857。)に基いて計算した。

$$\text{体積} = \frac{\text{幅}^2 \times \text{長さ}}{2}$$

組織病理学的な試験では、組織を、ルーチンの方法で10%中性緩衝ホルマリン中に固定し、脱水し、パラフィン包埋した。6ミクロンの組織切開を載せたスライドガラスを調製し、ヘマトキシリン／エオジンで染色した。関連のある主要なエンドポイントは、腫瘍成長、無腫瘍生存率であった。生命表結果の推定およびグループ間の結果の比較を公知の方法で行った(ウォルツニックら、*クリニカルキャンサーリサーチ*(Waurzyniak, et al., 1997, *Clinical Cancer Research*)、1997、3:881~890; アンダーソンら、*キャンサーリサーチ*(Anderson, et al., *Cancer Res.*) 1995、55:1321~1327; ウックンら、*ジャーナルオブクリニカルオンコロジー*(Uckun, et al., *J. Clin. Oncol.*)、1997、15:2214~2221)。

結果

複合体キナゾリンEGF-P154は、腫瘍細胞を接種24時間後に使用すると、用量依存的に無腫瘍生存率を有意に上昇させた。図7Aおよび7Bは、U373膠芽腫細胞を接種後、EGF-P154(500 μ g/kg/日 \times 10日 または1mg/kg/日 \times 10日)、非複合EGF(1mg/kg/日 \times 10日)、および非複合WHI-P154(1mg/kg/日 \times 10日)またはPBSで処理されたSCIDマウスの腫瘍成長および無腫瘍生存率を示す。

【0101】

PBS (N=5; 無腫瘍生存数メジアン=19日)、EGF (N=5; 無腫瘍生存数メジアン=23日)、または非複合WHI-P154 (N=5; 無腫瘍生存数メジアン=19日) で処理された15匹の対照マウスのうち、無腫瘍で33日以上生存したものはなかった (N=5; 無腫瘍生存日数メジアン=19日) (図7A)。EGF-P154により500 μ g/kg/日投与量レベルで処理した5匹のマウス全てで、40日以内に腫瘍が発生し、無腫瘍生存日数は33日であった (図7B)。これらの腫瘍は対照マウスの腫瘍よりずっと小さかった (図7B)。

【0102】

PBS処理マウスにおいては37.5 \pm 3.3日以内に、EGF処理マウスにおいては34.0 \pm 3.0日以内、WHI-P154処理マウスにおいては36.0 \pm 5.1日以内に腫瘍は50mm³に達した。EGF-P154 (500 μ g/kg/日 \times 10日) 処理マウスにおいては、腫瘍が成長して50mm³に達するのは、PBS、EGFまたはWHI-P154処理した対照マウスに比べて11日遅かった(47.4 \pm 7.1日対35.8 \pm 1.8日)。対照群 (すなわち、PBS + EGF群の組合せ) のマウスにおいてはそれぞれ、20日後、40日後の腫瘍の平均的な大きさ (平均値 \pm SE) は、それぞれ10.2 \pm 1.4 mm³、92.3 \pm 6.0 mm³だった。20日後、40日後の腫瘍の平均的な大きさ (平均値 \pm SE) の比較によれば、用量レベル500 μ g/kg/日のEGF-P154で処理されたマウスで1.0 \pm 1.1 mm³ (P = 0.002)、37.6 \pm 10.7 mm³ (P = 0.0003) と有意に小さかった。

【0103】

特に、10日間連続して1 mg/kg/日のEGF-P154で処理したマウスの40%は生存し続け、58日を超えて腫瘍は検出されなかった（PBS+EGF+WHI-P154対EGF-P154、ログランク試験において $P < 0.00001$ ）。残り60%のマウスにおける腫瘍成長は、58日間の観察中に $> 50 \text{ mm}^3$ を達成したものはなかった。したがって、EGF-P154は、適用した非毒性用量レベルにおいて、インビボ抗腫瘍活性を有意に誘起した。1 mg/kg/日 \times 10日のEGF-P154（2.9 nmolのWHI-P154に相当）を10日間投与することによる効力とは対照的に、10日間、1 mg/kg/日の非複合体WHI-P154（53.2 nmol）および非複合体EGFを投与しても、SCIDマウスモデルに無腫瘍生存率を付与する能力はないことから、EGF-P154のインビボ抗腫瘍活性がそのEGF部分のみに寄与するわけではないこと、またEGFとの複合が、インビボで膠芽腫細胞に対するWHI-P154の抗腫瘍活性を高めることが > 18 倍であったことがわかった。

【0104】

合わせて、実施例3～5の所見によれば、置換キナゾリン3-ブロモ4'-ヒドロキシフェニル)-アミノ-6,7-ジメトキシキナゾリン（WHI-P154）がヒト膠芽腫細胞に対して有意な細胞毒性を示すこと、およびその抗腫瘍活性が標的分子としてのEGFとの複合形成によって実質的に高められるという新規な証拠が示された。WHI-P154は、EGF-RキナーゼならびにSrcファミリーチロシンキナーゼの強力なインヒビターであるにもかかわらず、その膠芽腫細胞における細胞毒性はそのチロシンキナーゼ阻害性質のみに帰因するとは言えない。なぜなら、同等の強さのPTK阻害活性を持つ4-(3'-ブロモフェニル)-アミノ-6,7-ジメトキシキナゾリン（WHI-P79）がWHI-P154感受性膠芽腫細胞を殺傷することができないからである。同様に、ヒト白血病および乳癌細胞を殺傷可能ないくつかのPTKインヒビターは、膠芽腫細胞に対する検出できる細胞毒性がなかった。EGF複合WHI-P154に曝露された膠芽腫細胞はアポトーシスを示した。本試験においては、膠芽腫細胞に対し、WHI-P154を標的とするためにEGFを使用した、異なるサイトカインを有するIGFや膠芽腫関連抗原と反応する抗体等の他の生体作用物質

も、この新規なキナゾリン誘導体の効果的な標的分子となり得ることが期待される。

実施例6

置換キナゾリンによる膠芽腫細胞の接着の阻害

組織侵襲の多段階プロセスにおいて、腫瘍細胞はまず、表面インテグリン受容体を介して細胞外マトリックス蛋白質に接着し、周囲の組織に入る移動能力を得る。ラミニン、フィブロネクチン、I V型コラーゲン等のECM蛋白質が、腫瘍細胞の接着と移動に重要な役割を果たすと考えられている。ラミニン、フィブロネクチンおよびコラーゲンは、血管の基板や脳内の神経膠の外部との境界 (limitans externa) にあり、インサイチュで腫瘍細胞の接着や侵襲を促進することが発見されていた (カルボネット、エス、トレンド ニューロサイエンス (Carbonetto, S., Trends Neurosci.) 1984, 7:382~387; ルツカ ジェー ティー、アポダッカ ジー、スターン アール、ジャーナルオブニューロロジー (Rutka, J. T., Apodaca, G., Stern, R. J. Neurosurg) , 69:155~170; ヴェンストローム ケー エーおよびレイチャード エル エフ (Venstrom, K.A. and Reichard, L. F.) , 1993, FASEB J., 7:996~1003) 。これらのECM蛋白質のインテグリン媒介膠芽腫細胞接着に及ぼす作用を4つの異なるヒト膠芽腫 (U87, U373, T98およびU138) および1つの髄芽細胞腫 (ダオイ (Daoy)) 細胞ラインを用いて試験した。

細胞ライン

成人膠芽腫患者由来のヒト脳腫瘍細胞ラインU-87MG (カタログ#HTB-14)、U118MG (カタログ#HTB-15)、U-138MG (カタログ#HTB16)、U-373MG (カタログ#HTB-17)、T98-G (カタログ#CRL-1690) および髄芽細胞腫 (ダオイ) は、アメリカンタイプカルチャーコレクション (American Type Culture Collection) (ATCC) (ロックビル, メリーランド州) から入手し、10%のウシ胎児血清および抗体を添加したDMEMを用いた液体カルチャー中に保持した。インビトロ侵襲アッセイの化学的接着源として線維芽細胞条件培地を使用した。条件培地は、公知の方法によって調製した (アルビニ エー、イワモト ワイ、クレイマン エイチ ケイ、マ

ーチン ジー アール、アーロンソン エス エー、コゾロフスキー ジェー エムおよびマクエワン アール エヌ(Albini, A., Iwamoto, Y., Kleinman, H.K., Martin, G.R., Aaronson, S.A., Kozlowski, J.M., and McEwan, R.N.,) 1987, キャンサーリサーチ, 47:3239~3245)。この条件培地NIH/3T3胎児性線維芽腫(AATCCカタログ #CRL-1658)は、10%FBSを添加したDMEM中80%コフルエンシー(confluency)に成長させ、0.5(g/mlのウシ血清アルブミン(albumin))を含む無血清培地中で24時間培養した。その培溶液の上澄みを採取し、1000×gで15分間遠心分離し、細胞の残骸を除去し、条件培地として使用した。

接着アッセイ

(a)様々な膠芽腫細胞ラインのベースライン接着特性を調べるため、および(b)キナゾリン誘導体が膠芽腫細胞の接着特性に及ぼす影響を評価するために、インビトロ接着アッセイを行った。接着アッセイ用プレートに予め細胞外マトリックス蛋白質ラミニン、フィブロネクチンもしくはIV型コラーゲン(それぞれの最終濃度はPBS中1μg/ml)を塗布し、4℃で一晩、乾燥させた。実験を行う日、ウェルを再水和し、PBS中10%の牛血清アルブミンで常温で1時間固定し、接着アッセイのために下記のように使用した。

【0105】

膠芽腫細胞接着に及ぼすキナゾリン誘導体の効果を調べるために、指数関数的に成長しているDMEM中細胞を化合物WHI-P79、WHI-P97、WHI-P31、WHI-P154、WHI-P258もしくはゲニステインを用いて、1μM~100μMの範囲の濃度で、加湿5%CO₂雰囲気中で16時間インキュベーションした。DMSO(0.1%)を対照ベヒクルとして加えた。処理後、細胞を、DMEM中で再懸濁させた0.05%トリプシン(ライフテクノロジー(Life Technologies))を用いてフラスコから除去し、37℃で2時間インキュベーションし、トリプシン処理ストレスから回復し、ECM蛋白質を予め塗布したプレートに対する接着能力を評価した。

【0106】

接着アッセイにおいては、細胞を遠心分離し、無血清DMEMで2回洗浄し、計数し、無血清DMEM中で再懸濁させ、最終濃度を 2.5×10^5 個/mlとした。2

$.5 \times 10^4$ 個の細胞を含有する細胞懸濁液 $100 \mu\text{l}$ をそれぞれのウェルに添加し、加湿 $5\% \text{CO}_2$ 雰囲気中で1時間接着させた。MTT (3-[4, 5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2, 5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド)アッセイを用いて接着割合を定量した。簡単に言うと、ウェルを洗浄後、 $10 \mu\text{l}$ のMTT (最終濃度 0.5mg/ml) (ベーリンガーマンハイム、インディアナポリス、インディアナ州 (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN)) をそれぞれのウェルに添加し、プレートを 37°C で4時間インキュベーションし、代謝活性細胞と反応させることによってMTTをホルマザン結晶として形成させた。そのホルマザン結晶を一晩 37°C で 0.01M HCl 中 10% SDS を含有する溶液中に溶解した。各ウェルの吸収度をマイクロプレートリーダー (ラブシステムス (Labsystems)) 中で 540nm および基準波長 690nm で測定した。 OD_{540} 値を各ウェル中の細胞数に換算するために、 OD_{540} 値を各細胞ラインについて作製された標準 OD_{540} - 対細胞数曲線を用いて比較した。キナゾリン誘導体で処理された細胞の接着割合をDMSO処理した対照細胞と比較し、接着の阻害百分率を次式を用いて決定した。

$$\% \text{阻害率} = 100 \times [(1 - \text{薬物処理した細胞の接着割合}) / \text{対照細胞の接着割合}]$$

それぞれの処理条件を同一の別個の3つの実験で評価した。 IC_{50} 値を非線形回帰分析によって測定した。

結果

図8に示すように、ラミニン、I V型コラーゲンまたはフィブロネクチンを予め塗布したプレートに接着させた膠芽腫および髄芽細胞腫細胞のフラクションは、塗布しなかったもの、またはポリ-L-リジンを塗布した対照プレートより有意に大きかった。試験した4つの膠芽腫細胞ラインのうち、U373細胞が最も接着力が大きかった。したがって、U373細胞を様々なキナゾリン誘導体のインテグリン媒介膠芽腫細胞接着の効果を調べるためにデザインされた次の実験において使用した。

【0107】

図9A～9Dに示すように、新規なキナゾリン誘導体4-(3'-ブromo-4'-ヒ

ドロキシルフェニル)-アミノ-6, 7-ジメトキシキナゾリン (WH I-P154) (しかし、非置換親化合物WH I-P258ではない)は、U373細胞のラミニン、フィブロネクチン、およびコラーゲンを塗布したプレートへの接着を用量依存的に阻害した。平均IC50値は、フィブロネクチンを塗布したプレートにおいては $29.8 \pm 3.1 \mu\text{M}$ (N=3)、ラミニンを塗布したプレートにおいては、 $36.1 \pm 3.5 \mu\text{M}$ (N=3)、コラーゲンを塗布したプレートにおいては、 $42.7 \pm 2.5 \mu\text{M}$ (N=3)であった。フェニル環上の3'-ブromo置換基はWH I-P154の活性に寄与するようである。なぜなら、このブromo置換基を欠く4-(4'-ヒドロキシルフェニル)-アミノ-6,7-ジメトキシキナゾリン[WH I-P131]はWH I-P154より弱いからである(全てのIC50値: $> 50 \mu\text{M}$)。フェニル環上の4'-ヒドロキシル置換基もWH I-P154の阻害に寄与する。なぜならWH I-P154とフェニル環上の4'-ヒドロキシル基を欠くことが異なるだけの4-(3'-ブromoフェニル)-アミノ-6, 7-ジメトキシキナゾリン[WH I-P79]は効力が劣るからである(全てのIC50値: $> 50 \mu\text{M}$)。第二のブromo基をフェニル環の5'位に導入することによって阻害活性は改善されなかった: 4-(3', 5'-ジブromo-4'-ヒドロキシルフェニル)-アミノ-6, 7-ジメトキシキナゾリン[WH I-P97]は、WH I-P154より効力は低かった。

実施例7

WH I-P154がEGF誘発性細胞接着に及ぼす影響

ECM蛋白質への細胞表面受容体の接着およびインテグリンクラスターに加えて、局所接着プラークの形成も局所接着キナーゼの活性により、それらの受容体上に結合する特定の成長因子によって調整される (ハタイ エム、ハシ エイチ、モギ エー、ソガ エイチ、ヨコタ ジェー、ヤオイ ワイ (Hatai, M., Hashi, H., Mogi, A., Soga, H., Yokota, J., Yaoi, Y.), 1994, FEBS レター、350:113~116; オーウェンズ デー エム、ミッカーズ エイチ エム、ファンデルゾン ジーシー、スタイン ガーラック エム、アルリッチ エー、マサーン ジェー エー (Ouwens, D.M., Mikkers, H.M., van der Zon, G.C., Stein Gerlach, M., Ullrich, A., Maassen, J.A.), 1996, バイオケミストリージャーナル (Biochem J.)

、318:609～614；スカラー、エム ディー、パーソンス ジェーティー (Schaller, M.D., Parsons, J.T.)、カレントオピニオン、セル (Curr. Opin. Cell)；ザッカリー アイ (Zachary, I)、1997、インターナショナル ジャーナルオブバイオケミストリー、セルバイオロジー (Int. J. Biochem., Cell Biol.)、29:929～934)。EGFは、EGF受容体を発現する様々な脳腫瘍細胞の強力な分裂促進剤であり、細胞表面の発現を調整することが示されている。

【0108】

キナゾリン誘導体がEGF刺激細胞接着に及ぼす影響を調べるために、トリプシン処理し、回復された細胞をキナゾリンの濃度を1 μ M～50 μ Mで変化させながら、37℃で4時間インキュベーションし、その後250ng/mlのEGFで刺激し、ポリ-L-リジンを塗布されたプレートに対するそれらの接着を調べた。

【0109】

EGF刺激実験のために、細胞を250ng/mlのEGFの存在下でプレート化し、1時間接着させた。非接着性細胞を、PBSを用いて細胞を穏やかに洗浄しながら除去し、接着割合を実施例6に記載の方法で定量した。

【0110】

EGFによるU373の刺激は、ポリ-L-リジンを塗布されたプレートへの接着割合を33.2 \pm 5.2%～58.48 \pm 4.7% ($P<0.02$)の範囲で有意に上昇させた。U373細胞をWHI-P154を用いて4時間予備処理したところ、EGF誘発性接着を完全に阻止するのみならず、U373の接着割合を、EGFの有無に関わらず、ベースラインのはるか下方で用量依存的に減少させた (図10)。同様に、効力が低いにもかかわらず、細胞をWHI-P131で予備処理したとき、阻害効果が観察された。

実施例8

置換キナゾリンの膠芽腫細胞侵襲の阻害

マトリゲルマトリックスを介しての膠芽腫細胞の侵襲

膠芽腫細胞のインビトロ侵襲を、マトリゲルコーティングされた、8.0-(μ -孔ポリカーボネートフィルターインサートを備えたコースター24-ウェルトラ

ンスウェル細胞培養チャンバ（「ボイデンチャンバ」("Boyden chambers")）を用いて既知の方法で調べた（アルビニ エー、イワモト ワイ、クレイマン エイチ ケイ、マーチン ジー アール、アーロンソン エス エー、コゾロフスキー ジェー エムおよびマクエワン アール エヌ）、1987、キャンサーリサーチ、47:3239~3245）。チャンバーフィルターを50 $\mu\text{g/ml}$ のマトリゲルマトリックスでコーティングし、層流フードのもとで常温で一晩インキュベートし、4℃で保存した。マトリゲルマトリックスは、コラーゲン、ラミニン、およびプロテオグリカンを含む細胞外マトリックス（ECM）のいくつかの成分からなる。

【0111】

実験を行う日、コーティングされた挿入物を0.1%牛血清アルブミンを含有する0.5mlの無血清DMEMを用いて1~2時間再水和した。キナゾリン誘導体が膠芽腫細胞の侵襲性に及ぼす作用を調べるために、指数関数的に成長する細胞をWHI-P97、WHI-P131およびWHI-P154を用いて、1 μM ~50 μM の範囲の様々な濃度で一晩インキュベーションした。その細胞をトリプシン処理し、BSAを含有する無血清DMEMで2回洗浄し、計数し、 1×10^5 個/mlで再懸濁させた。キナゾリン化合物もしくはベヒクルを含有する無血清DMEM中に 5×10^4 個の細胞を含有する0.5mlの細胞懸濁液を、マトリゲルコーティングされ、再水和されたフィルターインサートに添加した。次に、750 (1のNIH線維芽細胞条件培地を化学誘引物質として24-ウェルプレートに入れ、前記インサートをウェル中に入れ、37℃で48時間インキュベーションした。インキュベーション期間後、前記フィルターインサートを除去し、培地をデカントし、フィルターの上部の移動しなかった細胞を、綿棒アプリケーションで掻き落とした。フィルター下部に移動した侵襲性の細胞を固定し、ヘマ（Hema）-3溶液で染色し、顕微鏡下で計数した。各フィルターにつき、5~10ランダムフィールドを計数し、侵襲割合の平均(±SE)値を求めた。キナゾリン誘導体で処理された細胞の侵襲割合をDMSO処理された対照細胞と比較し、次式を用いて侵襲性の阻害率を求めた。

%阻害率 = $100 \times [(1 - \text{薬物処理した細胞の接着割合}) / \text{対照細胞の接着割合}]$

別個の実験において各処理条件を評価した。IC₅₀値をグラフトプリシンソフトウェアバージョン2.0（グラフトソフトウェアインク、サンディエゴ、カリフォルニア州）（Graphpad Prism Software Version 2.0（Graphpad Software Inc., San Diego, CA））を用いて非線形回帰分析によって計測した。

結果

図11に示すように、U373膠芽腫細胞は、マトリゲルコーティングされたボイデンチャンバ内で非常に侵襲性が高かった。WHI-P154は、U373細胞のマトリゲルマトリックスを介しての侵襲性を用量依存的に阻害した。それはWHI-P131またはWHI-P97より強力だった（図11）。3つの別個の実験から得られた平均IC₅₀値は、WHI-P97で、 $10.59 \pm 1.8 \mu\text{M}$ （ $9.57 \sim 11.64 \mu\text{M}$ ）；WHI-P131で、 $7.07 \pm 1.8 \mu\text{M}$ （ $5.08 \sim 8.59 \mu\text{M}$ ）；そしてWHI-P154で、 $4.46 \pm 0.8 \mu\text{M}$ （ $3.53 \sim 5.01 \mu\text{M}$ ）であった。3つの実験の平均値からのIC₅₀値は、WHI-P97で、 $9.58 \mu\text{M}$ ；WHI-P131で、 $7.95 \mu\text{M}$ ；そしてWHI-P154で、 $5.2 \mu\text{M}$ であった。

実施例9

置換キナゾリンの局所接着プラークおよびアクチン重合の阻害

細胞骨格組織および細胞接着は、細胞の運動性を決定する2つの重要な決定因子であり、これらのプロセスは、アクチン細胞骨格再配列の複合体コーディネーション、および局所接着の変化によってコントロールされる（シモンズ エム エイチおよびミチスン ティー ジェー（Symons, M.H., and Mitchison, T.J.）、1991, ジャーナルオブセルバイオロジー（J. Cell Biol.）、114:503～513；ワング ワイ エル（Wang, Y.L.）、1984, ジャーナルオブセルバイオロジー、99:1478～1485；ブレッチャー エム エス、（Bretcher, M.S.）、1996, セル（Cell）、87:601～606；マケスキー エル エムおよびホール エー（Machesky, L.M., and Hall, A.）、1997, ジャーナルオブセルバイオロジー（J. Cell Biol.）、138:913～926）。アクチンフィラメントの重合、先端におけるラメレポディア（lamellipodia）およびフィラポディア（filapodia）の形成は、ECMからの細胞の付着および除去に必須であり、細胞運動性および移動において中枢的役割を果た

している（ブリッジ ケー、フェイス ケー、ケリージー、ターナーシー (Burridge, K., Fath, K., Kelly, G., and Turner, C.)、1988、アニュアルレビュー オフセルバイオロジー (Ann. Rev. Cell Biol.)、4:487~525；ブリッジ ケー、ヌコールス シー、オテイ エフ、パヴァルコ ケー、シモン ケー、ターナー シー (Burridge, K., Nuckolls, C., Otey, F., Pavalko, K., Simon, K., and TAurner, C.)、1990、セル ディファアー デヴェロプメント (Cell Differ. Dev.、32:337~342)。このプロセスにおいては接着プラークの形成もまた重要である。なぜなら、重合されたアクチン線維をこれらの結合部位においてECMとなぎ、結合させ、細胞の動きはこれらの局所的接着の強さに依存するからである。中等度の強さの細胞接着力が細胞の移動には重要であると考えられている（ブリッジ ケー、フェイス ケー、ケリージー、ターナーシー、1988、アニュアルレビュー オフセルバイオロジー、4:487~525；ブリッジ ケーおよびフェイス ケー、1989、バイオエッセイ (Bioessays)、10:104~108；シュバルツバウワ ジェー イー (Schwarzbauer, J.E.)、1997、カレントバイオロジー (Curr. Biol.)、7:292~294)。接着が強すぎると細胞運動性を損なう恐れがあり、接着が弱すぎると細胞を前進させる十分な運動量を付与することができないおそれがある。

【0112】

EGF誘発細胞接着は、高められたFAK⁺/アクチン⁺局所接着プラークの高められた形成によってもたらされ、それは、活性化されたFAKの再分配によって惹起される。血清の枯渇したU373細胞におけるEGF誘発性の局所接着の形成を、ネズミモノクローナル抗FAK抗体（緑色蛍光）およびアクチンを染色するローダミン標識ファロイジン（赤色蛍光）を用いて、マルチカラー免疫蛍光法および共焦レーザー走査マイクロスコーピーによって調べた。

【0113】

アクチン重合プロセスを評価するために、ポリ-L-リジンを塗布したプレートにプレートされた細胞をまず、血清を枯渇させて、アクチンストレスファイバーを解重合した。その後、細胞をウシ胎児血清で刺激し、デ・ノボストレスファイバー形成を誘発した。

蛍光マイクロスコープ

キナゾリン誘導体が局所接着プラークおよびアクチンの重合の形成に及ぼす影響を調べるために免疫蛍光法を行った。細胞（実施例6に記載の方法によって入手し、維持した）をポリ-L-リジンを塗布したガラス底35mmペトリ皿（マテックコーポ、アシュランド、マサチューセッツ州）、またはフィブロネクチンを塗布したカバーガラスにおき、10% F E Bを含有するD M E M中に24時間維持した。前記媒体を除去し、前記細胞を無血清D M E Mで2回洗浄し、同じ培地で16時間インキュベーションした。この血清枯渇に続いて、細胞をW H I - P 1 3 1、W H I - P 1 5 4またはベヒクル(0.1% DMSO)の濃度を変えながら、37℃で4～16時間インキュベーションし、250ng/mlのヒト組換えE G Fまたは10% F B Sで37℃で15、30、60、120または180分インキュベーションした。E G F刺激の終わりに、細胞をP B Sで2回洗浄し、P B S中2%パラホルムアルデヒド(pH 7.2)に固定し、透過性とし、非特異的結合部位を1.5% B S AおよびP B S中0.1% トリトンX-100中に30分間固定させた。

【0114】

局所接着プラークおよびアクチンを検出するために、細胞を1:100の希釈濃度の局所接着キナーゼに対するマウスモノクローナル抗体と、1:1000の希釈濃度のローダミン標識ファロイジンの混合物を用いて室温で1時間インキュベーションした。細胞をP B Sで洗浄し、F I T C複合抗マウスI g G（アマーシャムコーポ、アーリントンハイツ、イリノイ州(Amersham Corp., Arlington Heights, IL))を用いて、1時間インキュベーションした（最終希釈：1:40）。細胞をP B Sで洗浄し、トートー3(Molecular Probes, INC.)を用いて、希釈1:1000で、常温で10分対比染色し、再びP B Sで洗浄し、カバーガラスをベクタシールド(Vectashield)（ベクターラボ、バーリングゲーム、カリフォルニア(Vector Labs, Burlingame, CA))でカウントした。続いて、細胞をニコンラフフォトアップライト顕微鏡を備えた共焦レーザ走査顕微鏡（バイオラッド(Bio-Rad) MRC 1024)を用いて観察した。デジタル画像はジャズディスク(Jaz disk)に保存し、アドビフォトショップ(Adobe Photoshop)ソフトウェア（アド

ビシステム、マウンテンビュー、カリフォルニア州(Adobe systems, Mountain View, CA)) およびプリズムソフトウェアで処理した。各実験は3回繰り返した。

結果

図12A、12A'、12B、12B'、12C、12C'に示すように、EGFを有する2時間刺激した血清枯渴U373細胞は、高密度FAK染色(明るい緑の蛍光)を行った局所接着プラークの出現に伴っておこる核周囲/細胞質FAK染色を有意に減少させた。これらのFAK⁺接着プラークは、強いファロイジン染色(明るい赤の蛍光)を示し、アクチンが共局在したことを確認した。特に、U373細胞をWHI-P154(図12B)または、WHI-P131(データは示していない)を10 μ Mの濃度で用いて予備的にインキュベーションしたところ、EGF刺激後、FAK⁺/アクチン⁺局所接着プラークの形成を阻害した。

【0115】

アクチン重合プロセスを評価するため、ポリ-L-リジンを塗布されたプレートにプレートした細胞を、まず血清枯渴させ、アクチンストレスファイバーを解重合させた。続いて、細胞をウシ胎児血清で刺激し、デ・ノボストレスファイバー形成を誘発した。図13A~Cに示すように、2時間刺激した血清枯渴U373細胞をウシ胎児血清(10% v/v)で刺激したところ、重合化されたアクチンストレスファイバーが著明に増加した(図13C)。WHI-P131についても同様の結果が得られたが、非複合化ジメトキシキナゾリン化合物WHI-P258(データは示していない)については得られなかった。

【0116】

要約すると、実施例6~9に記載のデータは、腫瘍細胞の転移にとって重要な因子である膠芽腫細胞接着および移動における置換キナゾリンの有効性を示す。最も強力な阻害物質はWHI-P154およびWHI-P131であった。双方の化合物は、マイクロモル濃度で接着および移動を阻害した。

【0117】

受容体チロシンキナーゼおよびSrcファミリーチロシンキナーゼを含む細胞内分子の複合体ネットワークは、細胞が接着する基質や外部ファクター等のいく

つかの細胞外因子と相補的に、細胞の接着と運動性を調整する (フィンチマン ヴィー ジェーおよびフレーム エム シー (Finchman, V.J., and Frame, M.C.), 1998, EMBOジャーナル、17:81~92)。特異的な細胞外マトリックス蛋白質に結合するインテグリンファミリー接着受容体の活性は、インテグリンのフォスホリレーションおよびミトゲン活性化蛋白質キナーゼ、F A K、S r c チロシンキナーゼならびに S r c チロシンキナーゼの基質として同定されている p130^{cas}、タリン、パキシリン (paxillin)、コルタクチン (cortactin) を含むいくつかの細胞内シグナル蛋白質の活性を向上させることがわかった (コブ ビー エス、スカラー エム ディー、ロイ ティーエイチおよびパーソンズ ジェーティー (Cobb, B.S., Schaller, M.D., Leu, T.H., and Parsons, J.T.), 1994、モレキュラーセルバイオロジー (Mol. Cell Biol.)、14:147~155; チェンキューリン ティーエイチ、デルシージェー、ジュリアーノ アールエル (Chen, Q., Lin, T.H., Der, C.J., Juliano, R.L.), 1996、ジャーナルオブバイオロジカルケミストリー (J. Biol. Chem.)、271:18122~18127; クレームマック アールエル、カイ エス、ジャンニーニ エーエル、ガラー ピー ジェー、ラネロール ピーディー およびケレッシュディーエー (Klemke, R.L., Cai, S., Giannini, A.L., Gallagher, P.J., Lanerolle, P.D., and Cheresch, D.A.))、1997、ジャーナルオブセルバイオロジー (J. Cell Biol.)、137:481~492; ペッチ エルエー、ボックホルト エス エム、パーソン ジェーティー ブリッジケー (Petch, L.A., Bockholt, S.M., Bouton, A., Parsons, J.T., Burridge, K.), 1995、ジャーナルオブセルサイエンス (J. Cell Sci.) 108:1371~1379; クルザノースカーボディニカ エムおよびブリッジ ケー (Chrzanowska-Wodnicka, M., and Burridge, K.)、1996、ジャーナルオブセルバイオロジー、133(6):1403~15; ミヤモト エス、アキヤマ エス ケー、ヤマダ ケー エム (Miyamoto, S., Akiyama, S.K., Yamada, K.M.)、1995、サイエンス、267:883~5; ミヤモト エス、テラモトエイチ、グットカインド ジェーエスおよびヤマダケーエム (Miyamoto, S., Teramoto, H., Gutkind, J.S., and Yamada, K.M.)、1996、ジャーナルオブセルバイオロジー、135:1633~1642; チェン エイチ シー、アペデュー ピー エー、パーソン ジェーティー、ヒルドブランド ジェーディーおよびグアンジェーエル (Chen, H.C

., Appeddu, P.A., Parsons, J.T., Hildebrand, J.D., Schaller, M.D., and Guan, J.L.)、1995, ジャーナルオブバイオロジカルケミストリー (J. Biol. Chem) 1、16995~16999)。細胞の接着を活性化された Src キナーゼおよび局所接着する局所的接着キナーゼを再分布、活性化された細胞内蛋白質、例えばパクスリン (paxillin)、タリン、ビニキュリン (vinculin) 等の組換えおよび凝縮、およびインテグリンのクラスターによって強めた (ブリッジ ケー、フェイス ケー、ケリージーおよびターナーシー、1988、アニュアルレビュー セルバイオロジー、4:487~525; ブリッジ ケー、フェイス ケー、1989、バイオエッセイ、10:104~108; フィンチマンヴィージェーおよびフレーム エム シー、1998、EMB 0 ジャーナル、17:81~92)。FAK もまた特定の成長因子をその受容体とインテグリン活性とは独立のメカニズムによって結合させることによって活性化される (ハタイ エム、ハシ エイチ、モギ エー、ソガ エイチ、ヨコタ ジェー、ヤオイ ワイ、1994、FEBS レター、350:113~116; オーウェンズ デー エム、ミッカー ス エイチ エム、ファンデルゾン、ジーシー、スタイン ガーラック エム、アルリッチ エー、マサーン ジェー エー、1996、バイオケミストリージャーナル、318:609~614)。

【0118】

ここに示していない実験において、WHI-P154 は、EGF-R チロシンキナーゼならびに Src ファミリーチロシンキナーゼの強力なインヒビターであることがわかっている (リウおよびウクン、調製のテキスト)。したがって、WHI-P154 の膠芽腫細胞に及ぼす効果は、そのチロシンキナーゼの阻害性によるものであったとまず仮定される。しかしながら、驚くべきことに、等しい強度の EGF-R および Src ファミリーチロシンキナーゼの阻害剤である WHI-P79 と WHI-P131 は、WHI-P154 ほど効果的でなく、また広い範囲のチロシンキナーゼインヒビターゲニステインは、膠芽腫の細胞接着性および運動性を、EGF-R キナーゼおよび Src ファミリーチロシンキナーゼの酵素活性を止める濃度で阻害しなかった。したがって、WHI-P154 の U373 細胞への効果はそのチロシンキナーゼ阻害性質のみによっては説明できない。

実施例10

WHI-P154のスフェロイドからの膠芽腫細胞移動の阻止

直径200～400マイクロメートルのU373膠芽腫スフェロイドを0.1% DMSO中WHI-P154で濃度を変えながら処理した。細胞をインヒビターもしくは対照DMSOと共に、インヒビター化合物の不存在化で2時間インキュベーションし、続いて、フィブロネクチンを塗布したカバーガラス上に移した。そのスフェロイドをWHI-P154を含有するDMEM中で37℃で48時間インキュベーションした。

【0119】

図14A～14Dに示すように、膠芽腫スフェロイドをWHI-P154で処理することによって、スフェロイドからの細胞の移動は、非処理の対照と比較して、用量依存的に有意に阻害された。A：対照；B：2.5 μ M；C：4.5 μ MおよびD：10 μ M。

実施例11

WHI-P292の細胞毒素活性

新規な化合物WHI-P292について、実施例3に記載の方法で、MTT細胞生存アッセイにおいて細胞毒活性を調べた。図15に示すように、この化合物は強力な膠芽腫細胞に対する強力な細胞毒活性を示した。IC₅₀は38.22 μ Mであった。

【0120】

ここに述べた全ての文献、特許および特許文献は完全に発表されているものは引例として組み込んだ。ここに記載の発明は、別の実施の形態を含んでもよい。それら全ての自明な変形は、下記請求項に記載の本発明の範囲に属する。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1Aおよび1Bは、WHI-P154および本発明の他の化合物のU373膠芽腫細胞に対する細胞毒活性を示す細胞生存率のグラフである。

【図2】

図2Aおよび2Bは、免疫染色された細胞のレーザ分析写真であり、U373

およびU87ヒト膠芽腫細胞上でのEGF受容体の細胞表面発現を示している。

【図3】

図3A、3A'、3B、3B'、3C、3C'、3Dおよび3D'は、免疫染色された細胞のレーザ分析写真であり、U373ヒト膠芽腫細胞によるEGF-P154のEGF-R媒介性の取り込みを示している。

【図4】

図4Aおよび4Bは、WHI-P154およびEGF-P154のヒト膠芽腫細胞による取り込みを示す写真である。

【図5】

図5Aは、脳腫瘍細胞に対するEGF-P154の細胞毒素活性を示すグラフである。図5Bは、EGF-R陰性白血病細胞に対する非複合型WHI-P154およびEGF-P154の細胞毒素活性を示す。

【図6】

図6A～6Eは、EGFおよびEGF-P154によって処理された神経膠腫細胞の形態学的特徴を示す写真である。

【図7】

図7Aおよび7Bは、WHI-P154およびEGF-P154によって処理されたSCIDマウスヒト膠芽腫モデルにおける腫瘍容積と無腫瘍生存時間の関係を示すグラフである。

【図8】

図8は、様々なECM蛋白質を塗布したプレートへの膠芽腫細胞および髄芽腫細胞の接着を示す棒グラフである。

【図9】

図9A～9Dは、本発明の化合物の存在下での細胞のECM蛋白質への接着の阻害を示す棒グラフである。

【図10】

図10は、本発明の化合物の存在下でのEGF誘発性細胞の接着の阻害を示すグラフである。

【図11】

図11Aおよび11Bは、本発明の化合物の存在下での脳腫瘍細胞の細胞外マトリックス、マトリゲルマトリックスを介しての移動の阻害を示すグラフである。

【図12】

図12A～Cおよび12A'～C'は、免疫染色された細胞の写真であり、本発明の化合物の存在下での膠芽腫細胞における局所接着複合体形成の阻害を示している。

【図13】

図13A～13Cは、免疫染色された細胞の写真であり、本発明の化合物と接触している膠芽腫細胞におけるアクチンストレスファイバー形成の阻害を示している。

【図14】

図14A～14Dは、本発明の化合物の存在下での膠芽腫スフェロイド細胞からの腫瘍細胞自然成長の阻害を示す写真である。

【図15】

図15は、WHI-P292の膠芽腫細胞に対する細胞毒作用を示すグラフである。

【图1】

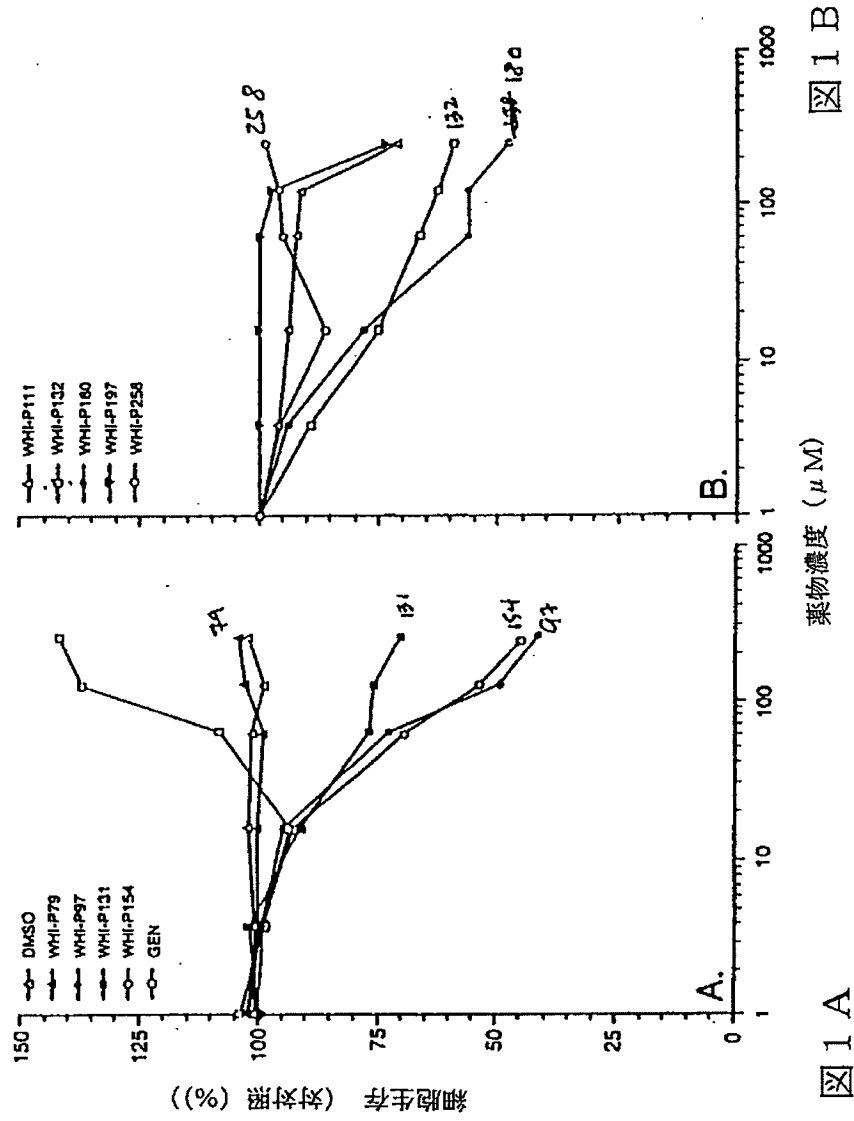


图1 A

藥物濃度 (μM)

图1 B

【図2】

図2 A

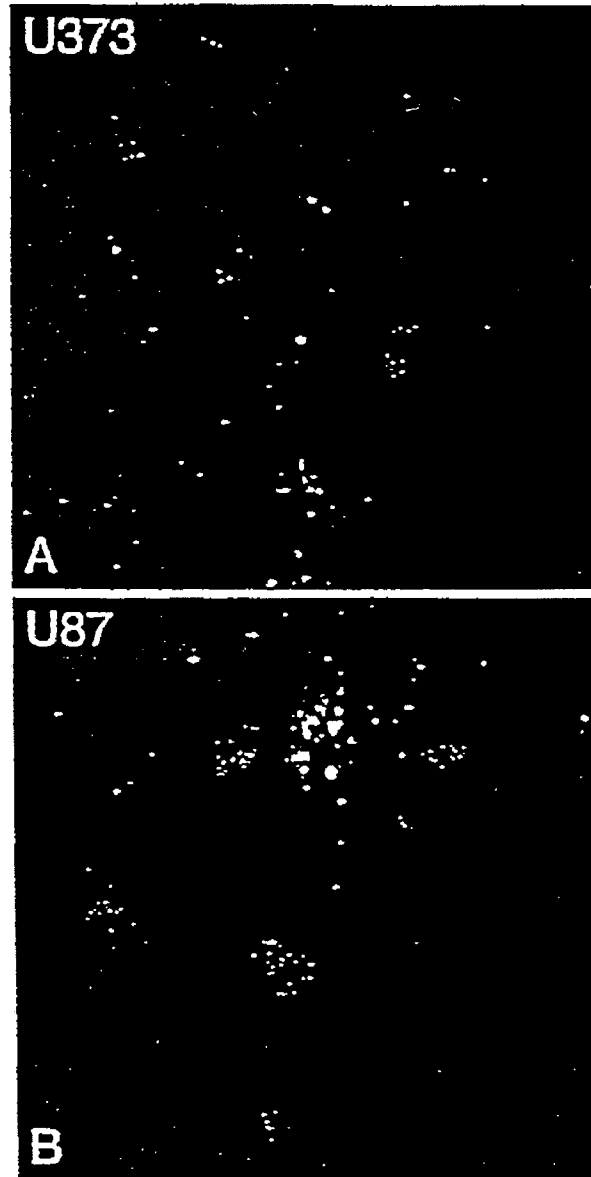
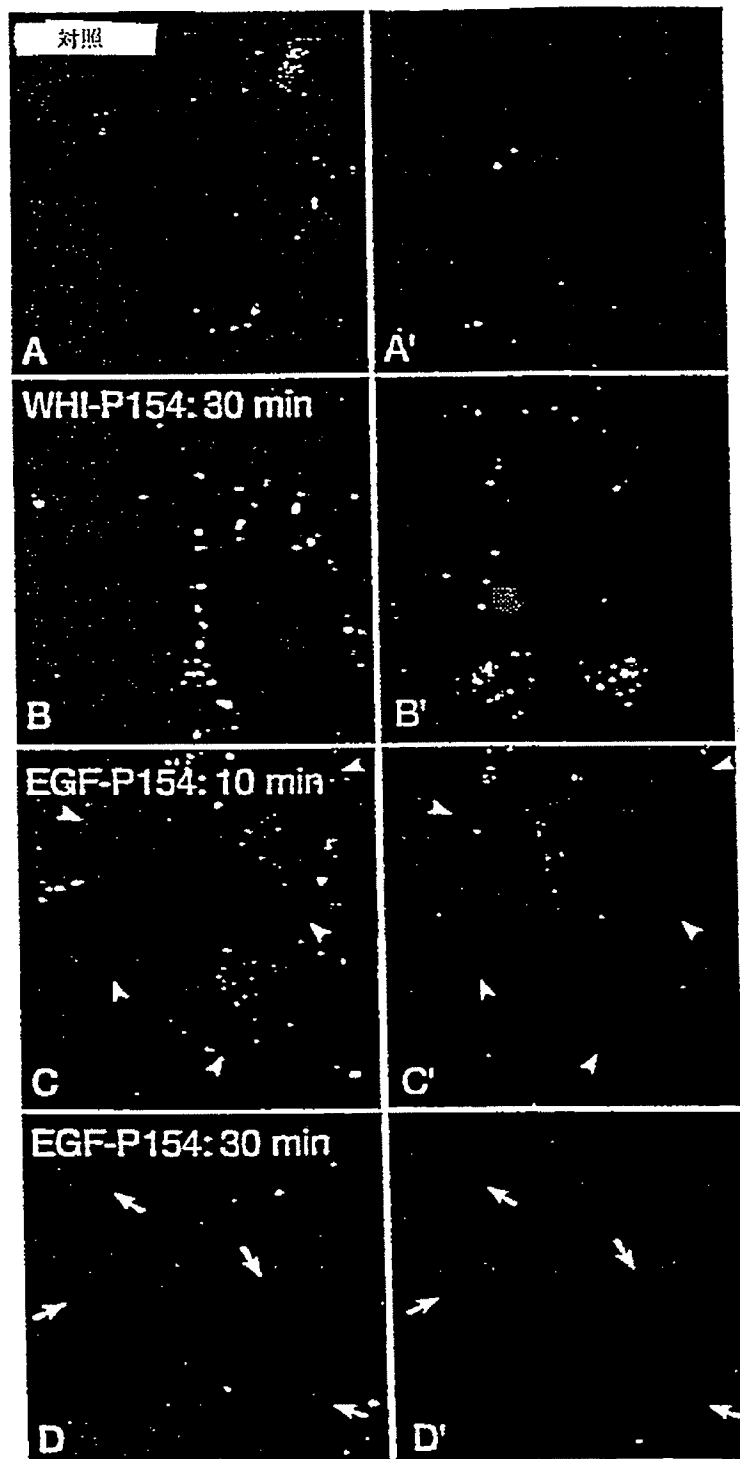
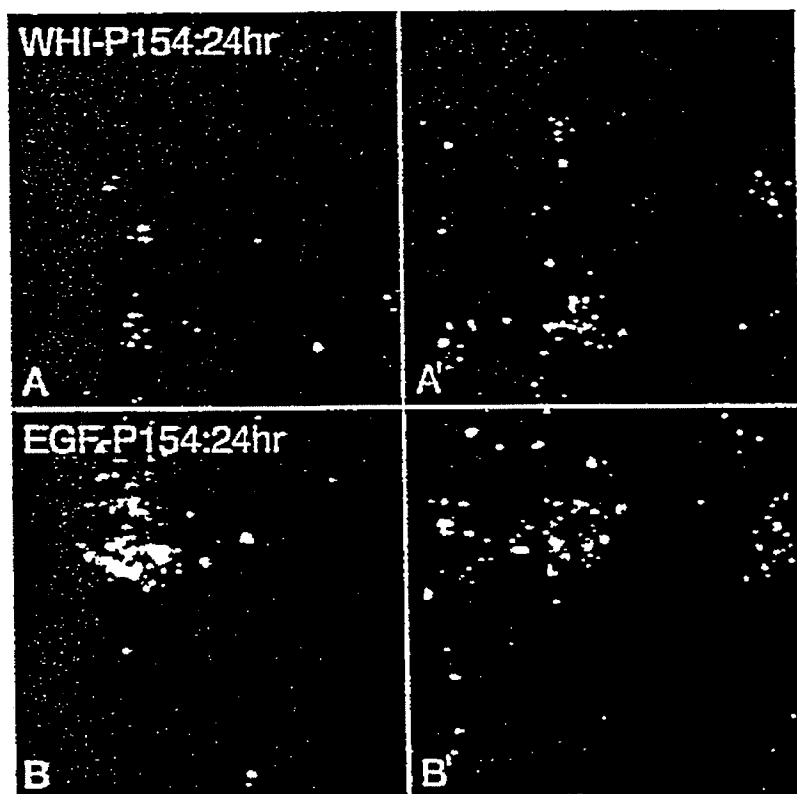


図2 B

【図3】



【図4】



【図5】

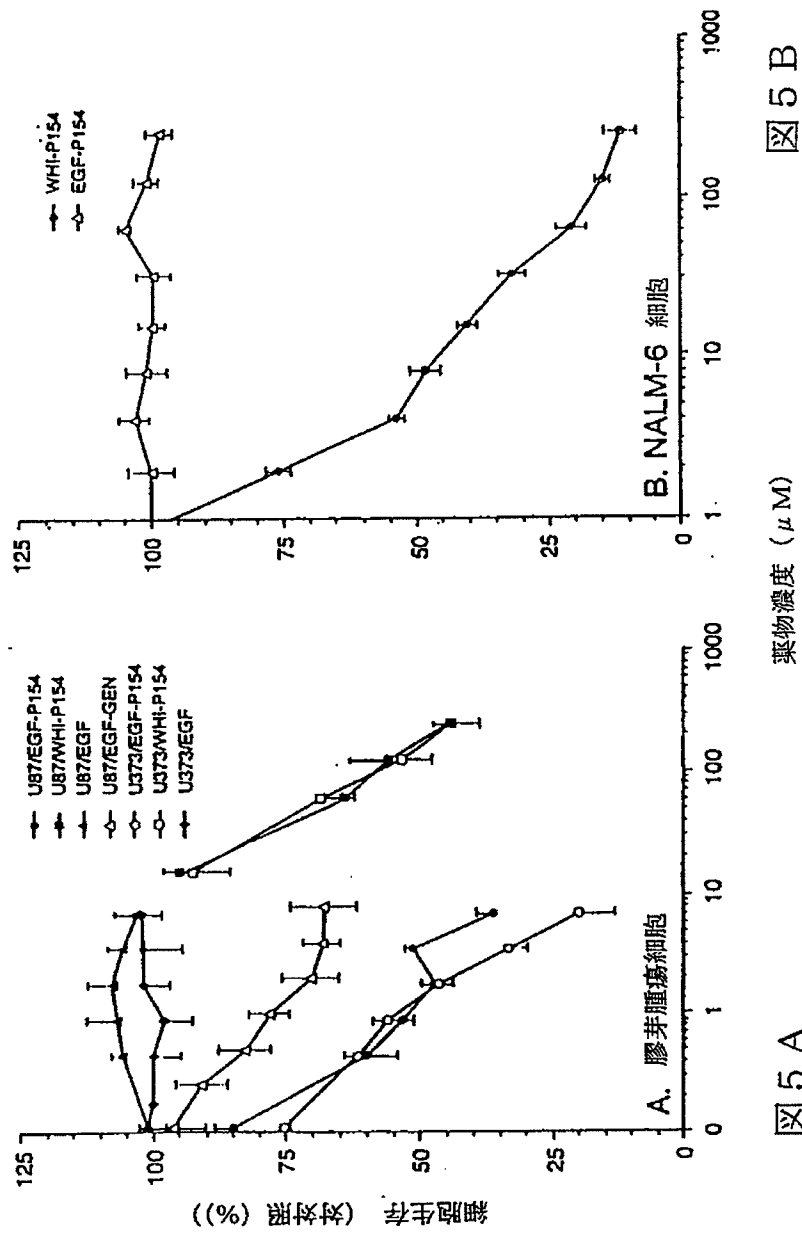
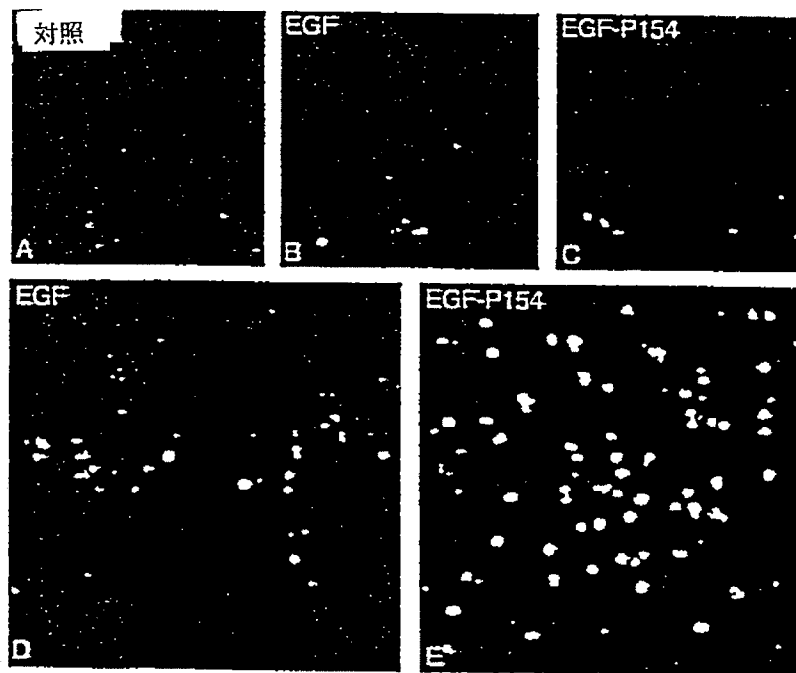


図5 B

薬物濃度 (μM)

図5 A

【図6】



【図7】

図7 A

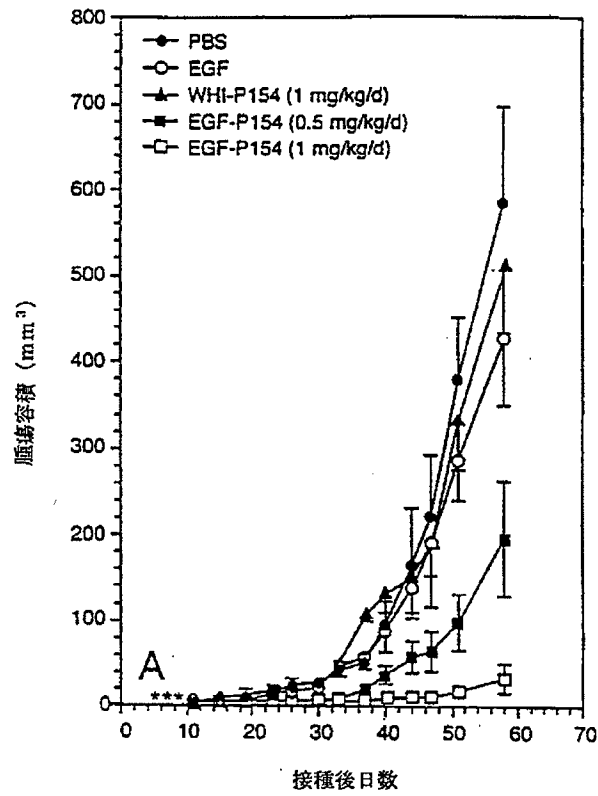
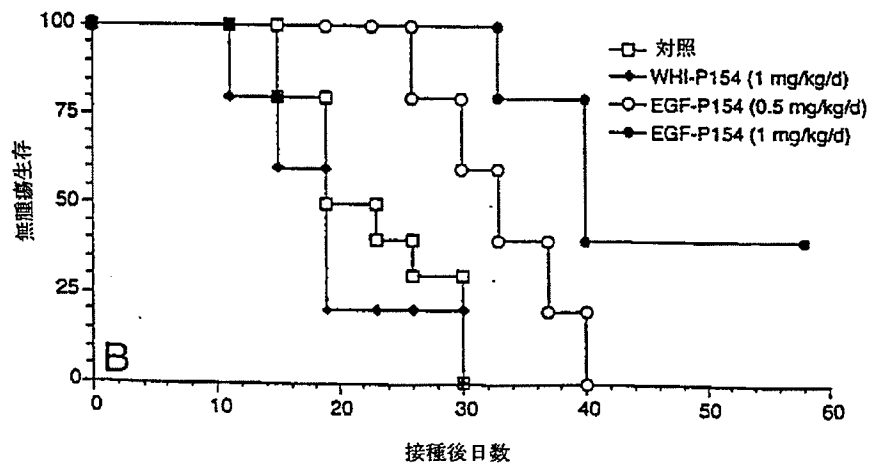
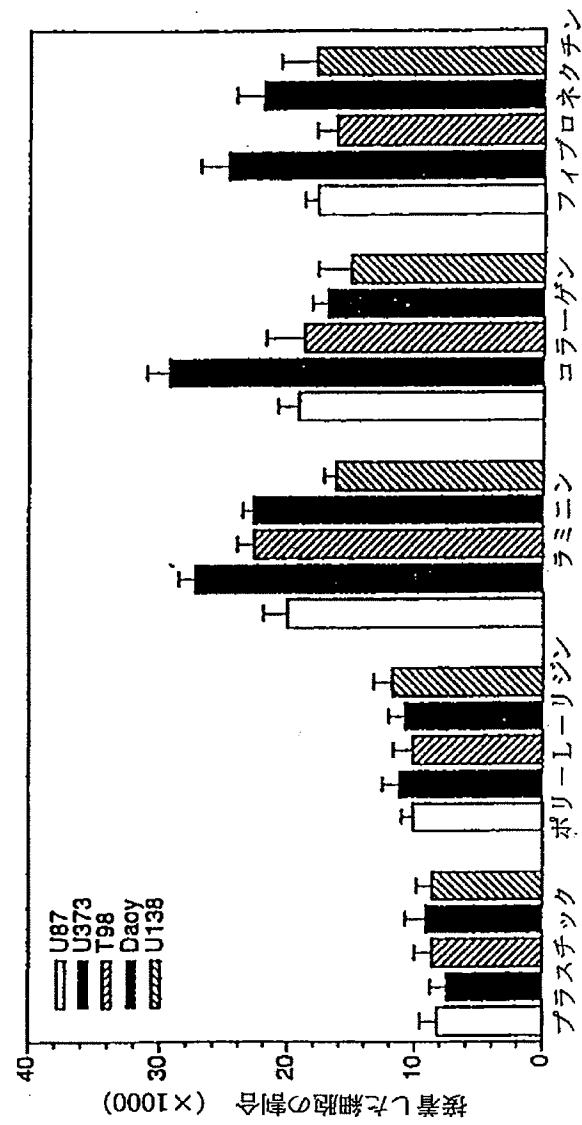


図7 B



【図8】



【図9】

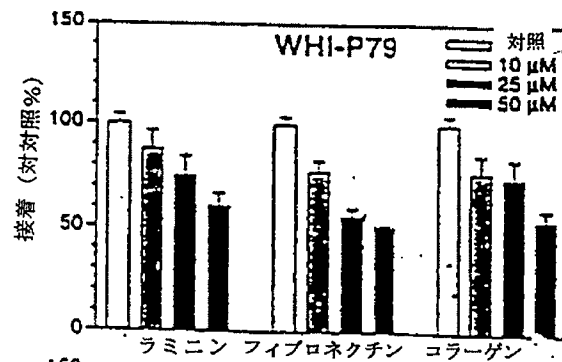


図9 A

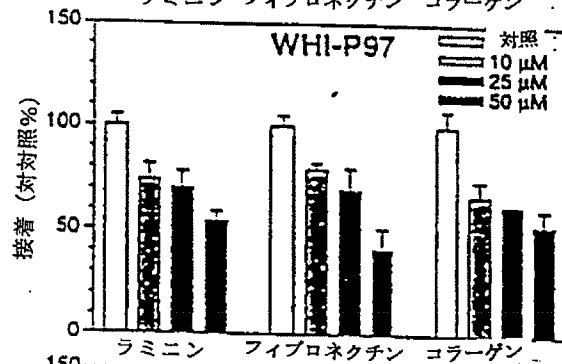


図9 B

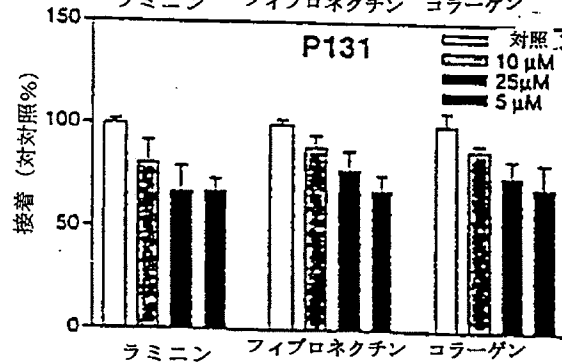


図9 C

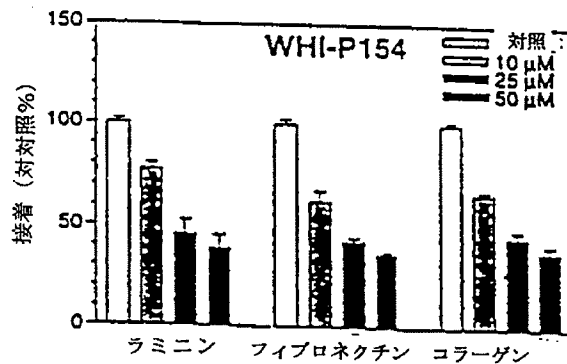
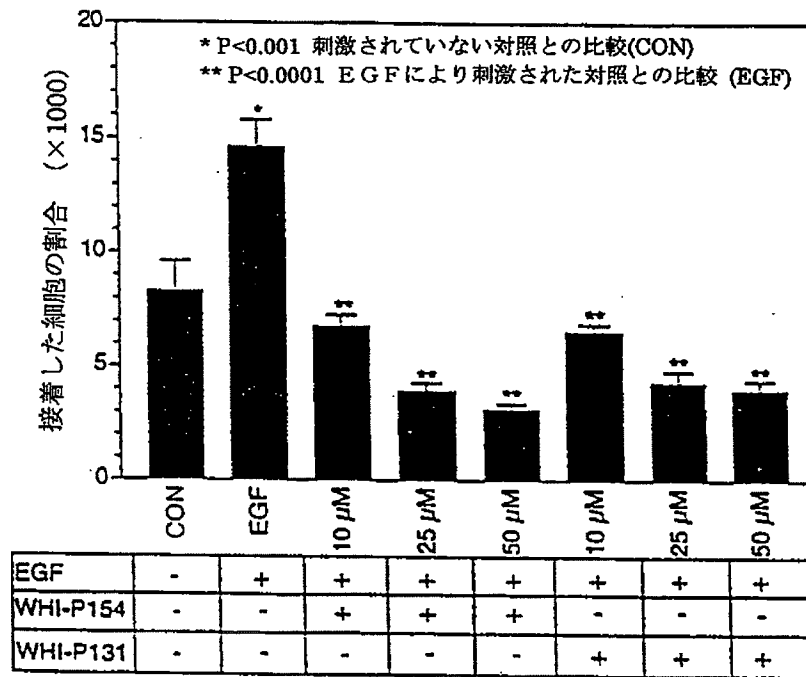


図9 D

【図10】



【図11】

図11A

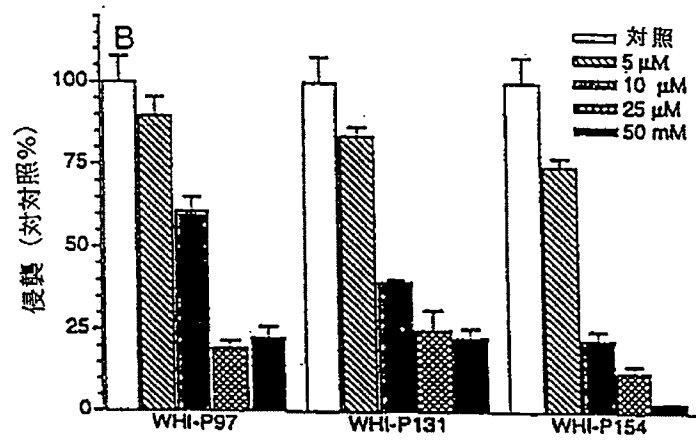
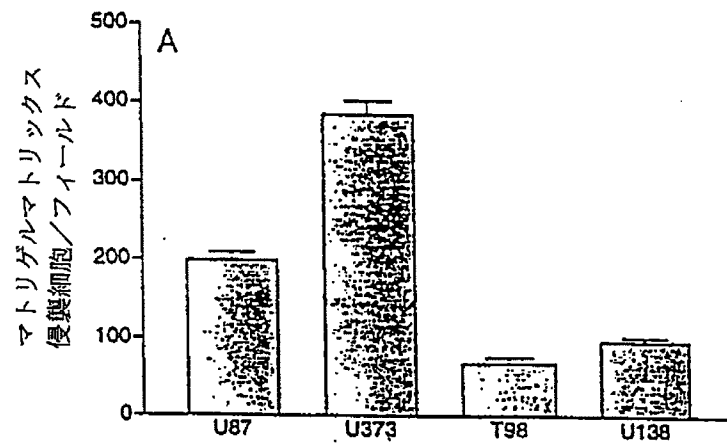
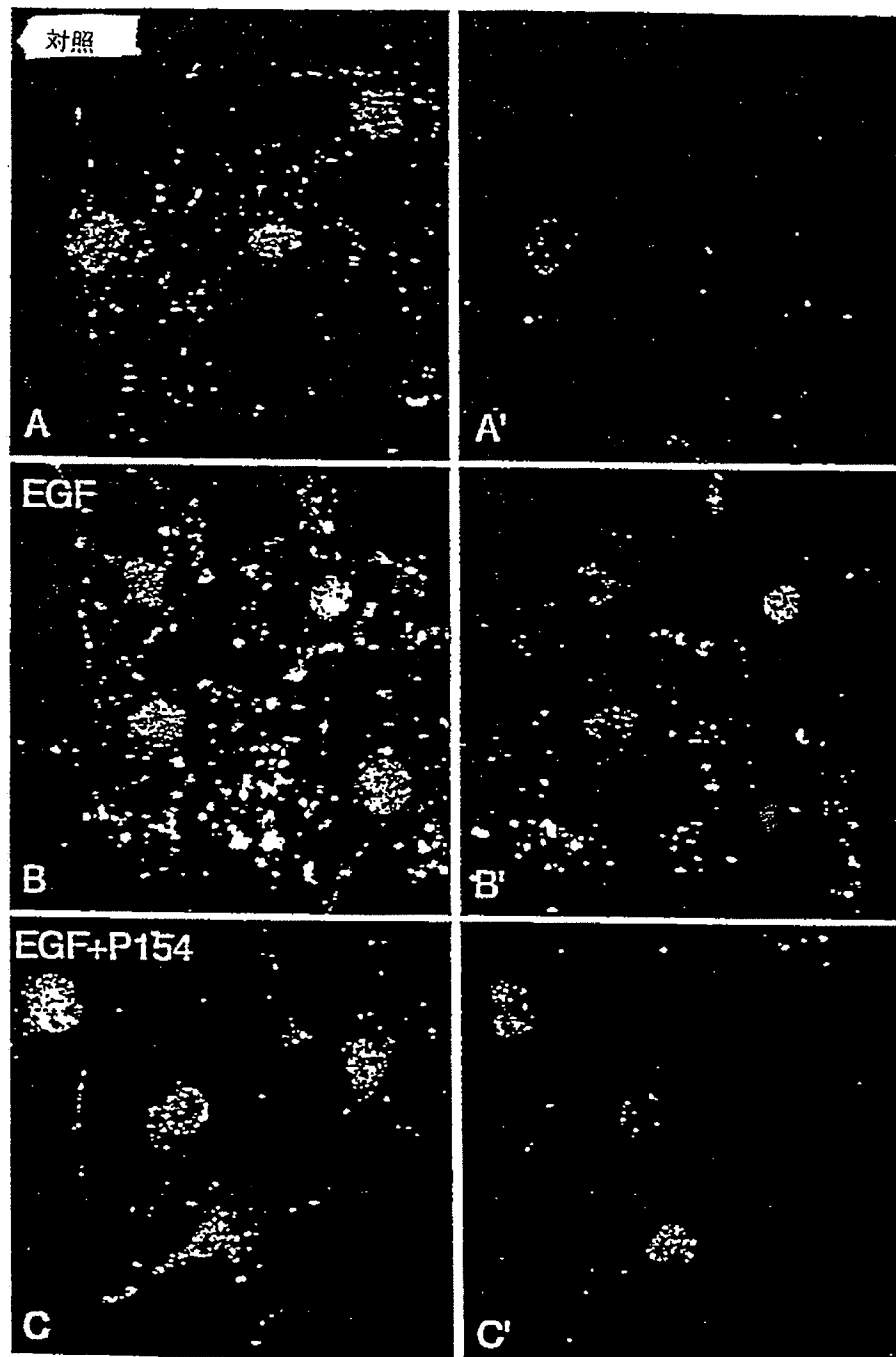
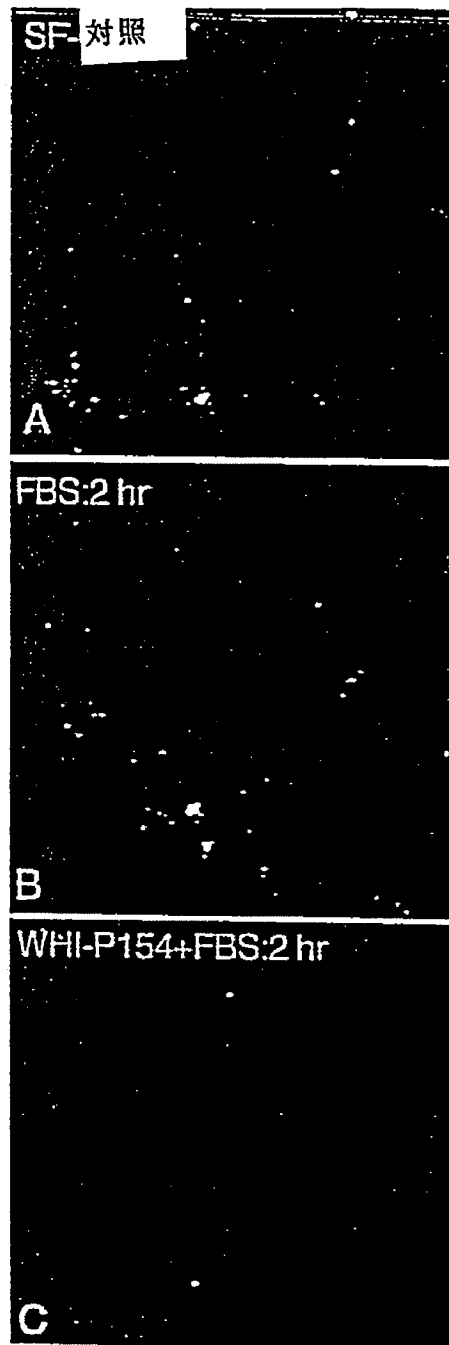


図11B

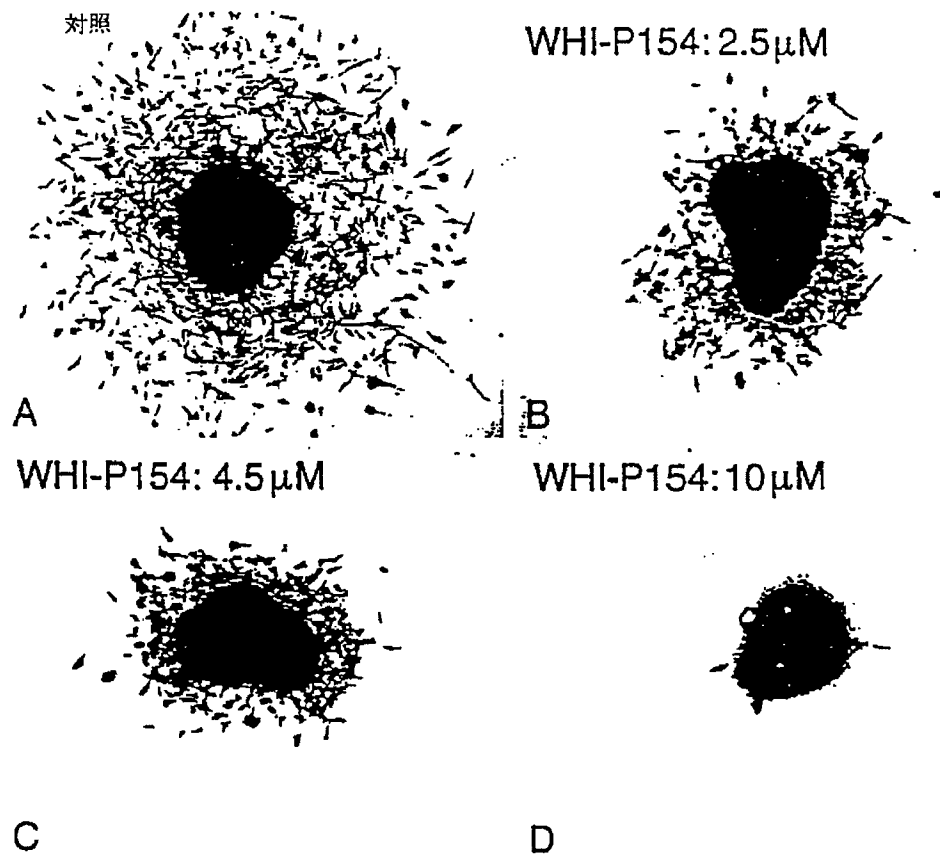
【图12】



【図13】

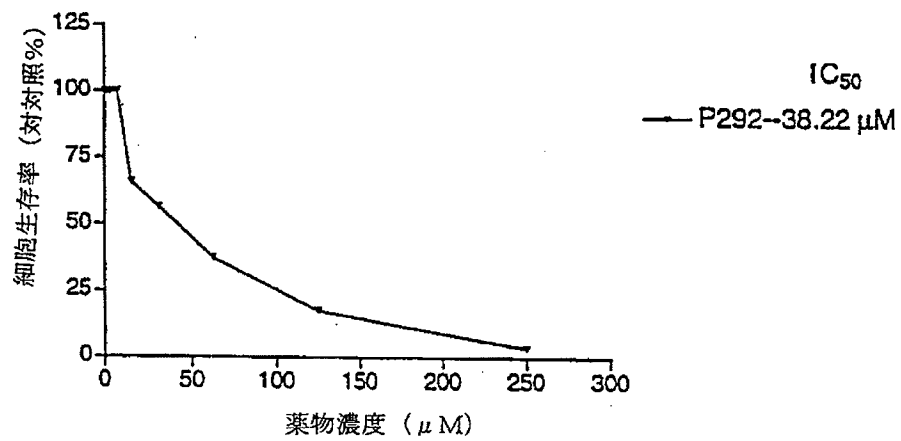


【図14】



【図15】

P-292 がU373 細胞生存に及ぼす作用 (MTT)



【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成12年7月11日(2000. 7. 11)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

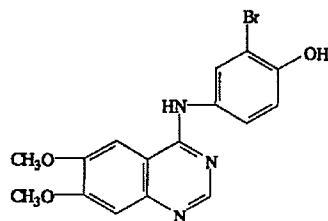
【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

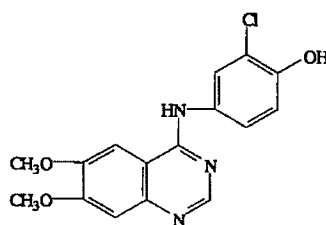
【請求項1】 下記構造式で表される化合物。

【化1】



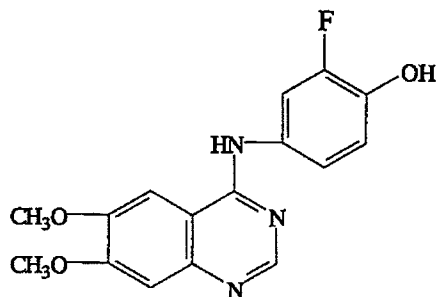
【請求項2】 下記構造式で表される化合物。

【化2】



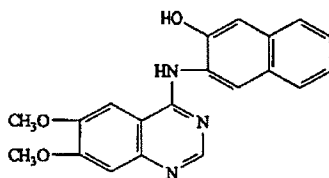
【請求項3】 下記構造式で表される化合物。

【化3】



【請求項4】 下記構造式で表される化合物。

【化4】



【請求項5】 請求項1に記載の化合物と等張担体を含む組成物。

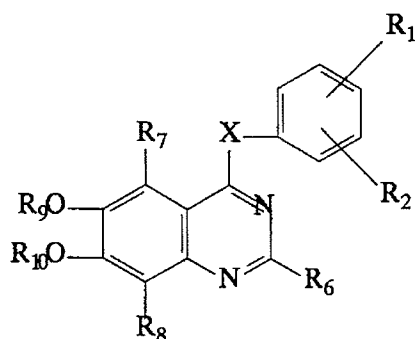
【請求項6】 請求項2に記載の化合物と等張担体を含む組成物。

【請求項7】 請求項3に記載の化合物と等張担体を含む組成物。

【請求項8】 請求項4に記載の化合物と等張担体を含む組成物。

【請求項9】 脳腫瘍細胞をアポトーシス誘発効果量の下記式で表される化合物または薬学的に受け入れられるそれらの酸付加塩に接触させることを含む脳腫瘍細胞のアポトーシスを誘発するための方法。

【化5】



但し、Xは、HN、 R_{11} N、 CH_2 および $R_{11}CH$ からなる群から選択され；

R_{11} は、H、炭素数4までのアルキル、またはアシルであり、アシルは $-C(O)$ であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルであり；

R_1 は、ハロゲンであり；

R_2 は、OHであり；

R_6 、 R_7 および R_8 は、同一でも異なってもよく、それぞれH、OH、SH、 NH_2 、 NO_2 、ハロゲン、炭素数4までのアルコキシ、炭素数4までのアルキルチオ、およびアシルからなる群から選択され、アシルは $-C(OR)$ であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルであり；および

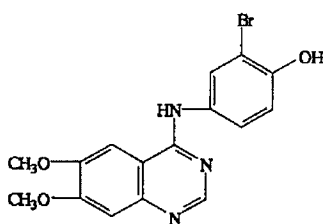
R_9 および R_{10} は、同一でも異なってもよく、それぞれH、炭素数4までのアルキル、およびアシルからなる群から選択され、アシルは $-C(OR)$ であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルである。

【請求項10】 XがHNである請求項10に記載の方法。

【請求項11】 前記化合物が下記式で表される請求項11に記載の方法

。

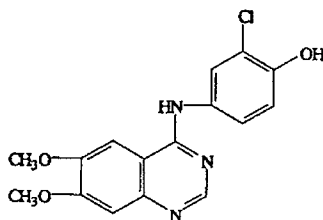
【化6】



【請求項12】 前記化合物が下記式で表される請求項10に記載の方法

。

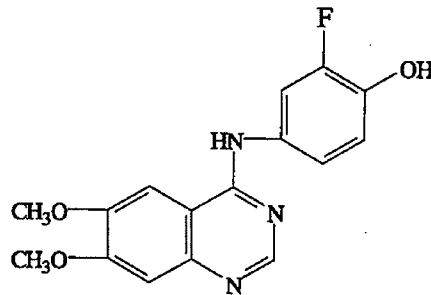
【化7】



【請求項13】 前記化合物が下記式で表される請求項10に記載の方法

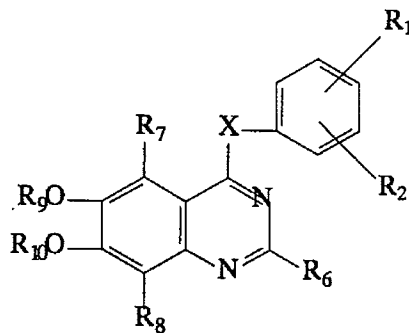
。

【化8】



【請求項14】 脳腫瘍細胞を下記式で表される化合物または薬学的に受け入れられるそれらの酸付加塩に接触させることを含む脳腫瘍細胞の接着および移動を阻害する方法。

【化9】



但し、Xは、HN、R₁₁N、CH₂およびR₁₁CHからなる群から選択され；

R₁₁は、H、炭素数4までのアルキル、またはアシルであり、アシルは-C(O R)であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルであり；

R₁は、ハロゲンであり；

R₂は、OHであり；

R₆、R₇およびR₈は、同一でも異なってもよく、それぞれH、OH、SH、NH₂、NO₂、ハロゲン、炭素数4までのアルコキシ、炭素数4までのアルキルチオ、およびアシルからなる群から選択され、アシルは-C(OR)であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルであり；および

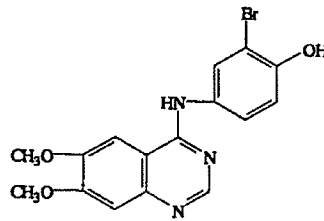
R₉ および R₁₀ は、同一でも異なってもよく、それぞれH、炭素数4までのアルキル、およびアシルからなる群から選択され、アシルは-C(OR)であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルである。

【請求項15】 XがHNである請求項14に記載の方法。

【請求項16】 前記化合物が下記式で表される請求項15に記載の方法

。

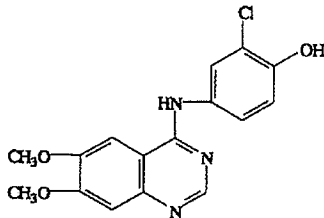
【化10】



【請求項17】 前記化合物が下記式で表される請求項15に記載の方法

。

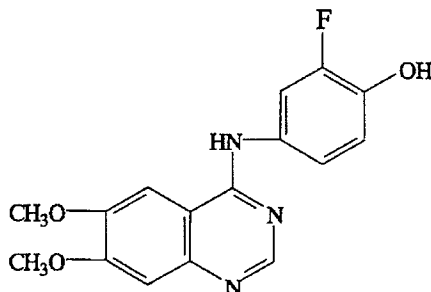
【化11】



【請求項18】 前記化合物が下記式で表される請求項15に記載の方法

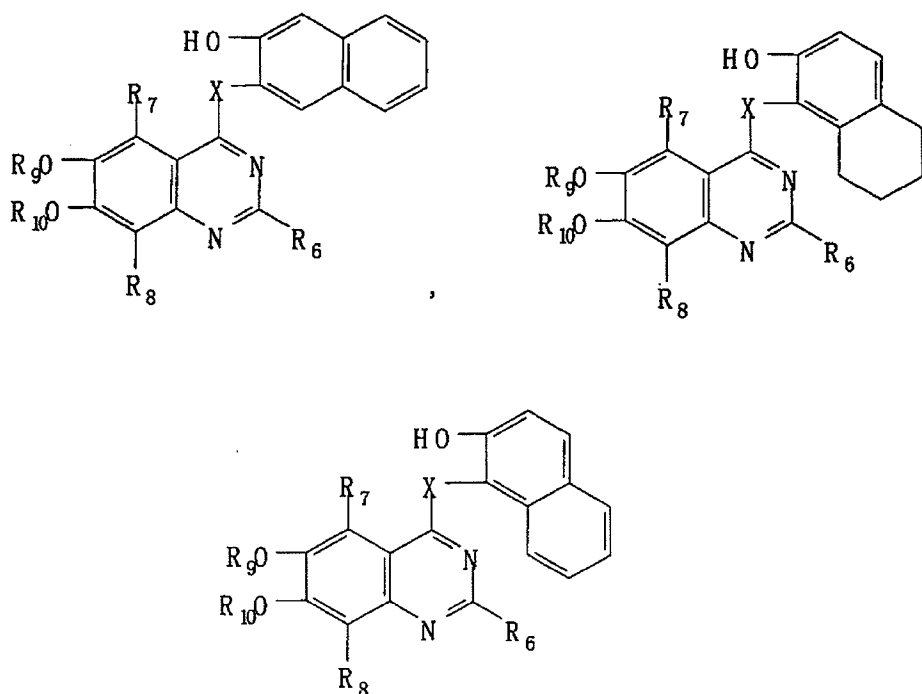
。

【化12】



【請求項19】 脳腫瘍細胞をアポトーシス誘発効果量の下記式で表される化合物または薬学的に受け入れられるそれらの酸付加塩と接触させることを含む脳腫瘍細胞のアポトーシスを誘発する方法。

【化13】



但し、Xは、HN、R₁₁ N、CH₂およびR₁₁ CHからなる群から選択され；
 R₁₁ は、H、炭素数4までのアルキル、またはアシルであり、アシルは—C（OR）であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルであり；同一でも異なってもよく、それぞれH、OH、SH、NH₂、NO₂、ハロゲン、炭素数4までのアルコキシ、炭素数4までのアルキルチオ、およびアシルからなる群から選択され、アシルは—C（OR）であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルであり；
 R₆、R₇およびR₈は、同一でも異なってもよく、それぞれH、OH、SH、NH₂、NO₂、ハロゲン、炭素数4までのアルコキシ、炭素数4までのアルキルチオ、およびアシルからなる群から選択され、アシルは—C（OR）であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルであり；および
 R₉およびR₁₀ は、同一でも異なってもよく、それぞれH、炭素数4までのアル

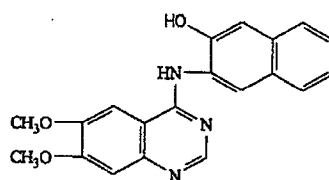
キル、およびアシルからなる群から選択され、アシルは—C(OR)であり、RはHまたは炭素数4までのアルキル、または、薬学的に受け入れられるそれらの酸付加塩である。

【請求項20】 XがHNである請求項19に記載の方法。

【請求項21】 前記化合物が下記式で表される請求項20に記載の方法

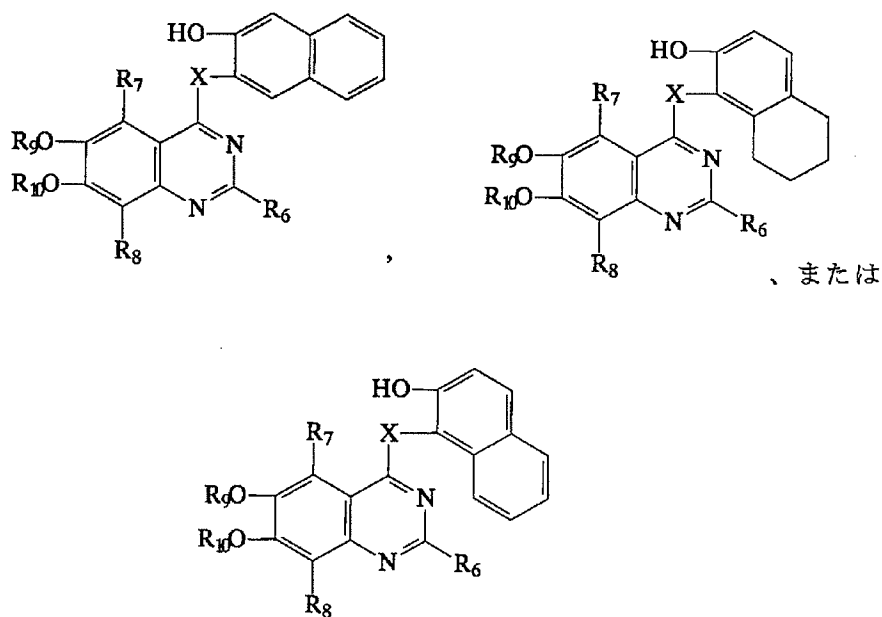
。

【化14】



【請求項22】 脳腫瘍細胞を下記式で表される化合物または薬学的に受け入れられるそれらの酸付加塩と接触させることを含む脳腫瘍細胞の接着および移動を阻止する方法。

【化15】



但し、Xは、HN、R₁₁N、CH₂およびR₁₁CHからなる群から選択され；

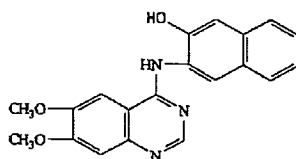
R₁₁ は、H、炭素数4までのアルキル、またはアシルであり、アシルは—C (OR) であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルであり；同一でも異なってもよく、それぞれH、OH、SH、NH₂、NO₂、ハロゲン、炭素数4までのアルコキシ、炭素数4までのアルキルチオ、およびアシルからなる群から選択され、アシルは—C (OR) であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルであり；
R₆、R₇およびR₈は、同一でも異なってもよく、それぞれH、OH、SH、NH₂、NO₂、ハロゲン、炭素数4までのアルコキシ、炭素数4までのアルキルチオ、およびアシルからなる群から選択され、アシルは—C (OR) であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルであり；および
R₉およびR₁₀ は、同一でも異なってもよく、それぞれH、炭素数4までのアルキル、およびアシルであり、アシルは—C (OR) であり、RはHまたは炭素数4までのアルキル、または、薬学的に受け入れられるそれらの酸付加塩である。

【請求項23】 XがHNである請求項22に記載の方法。

【請求項24】 前記化合物が下記式で表される請求項23に記載の方法

。

【化16】



【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成12年8月7日(2000. 8. 7)

【手続補正1】

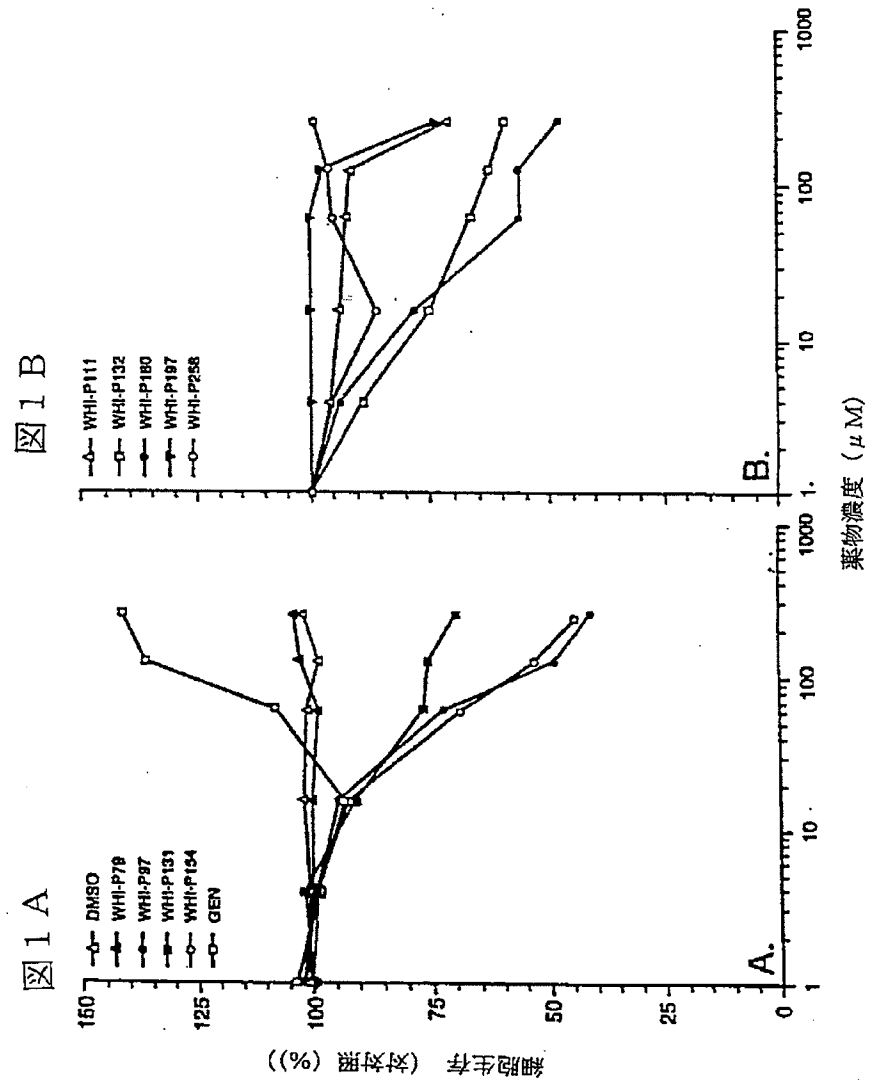
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

【補正方法】変更

【補正内容】

【図1】



【図2】

図2A

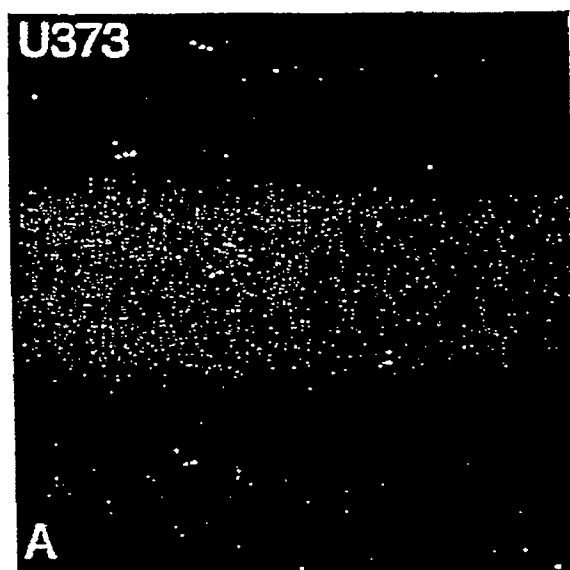
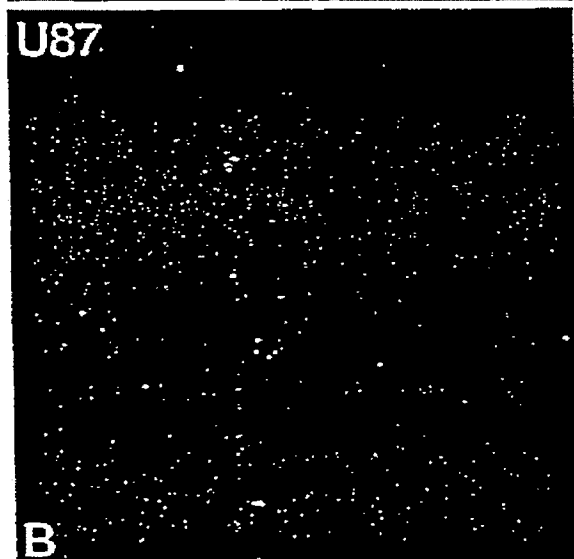
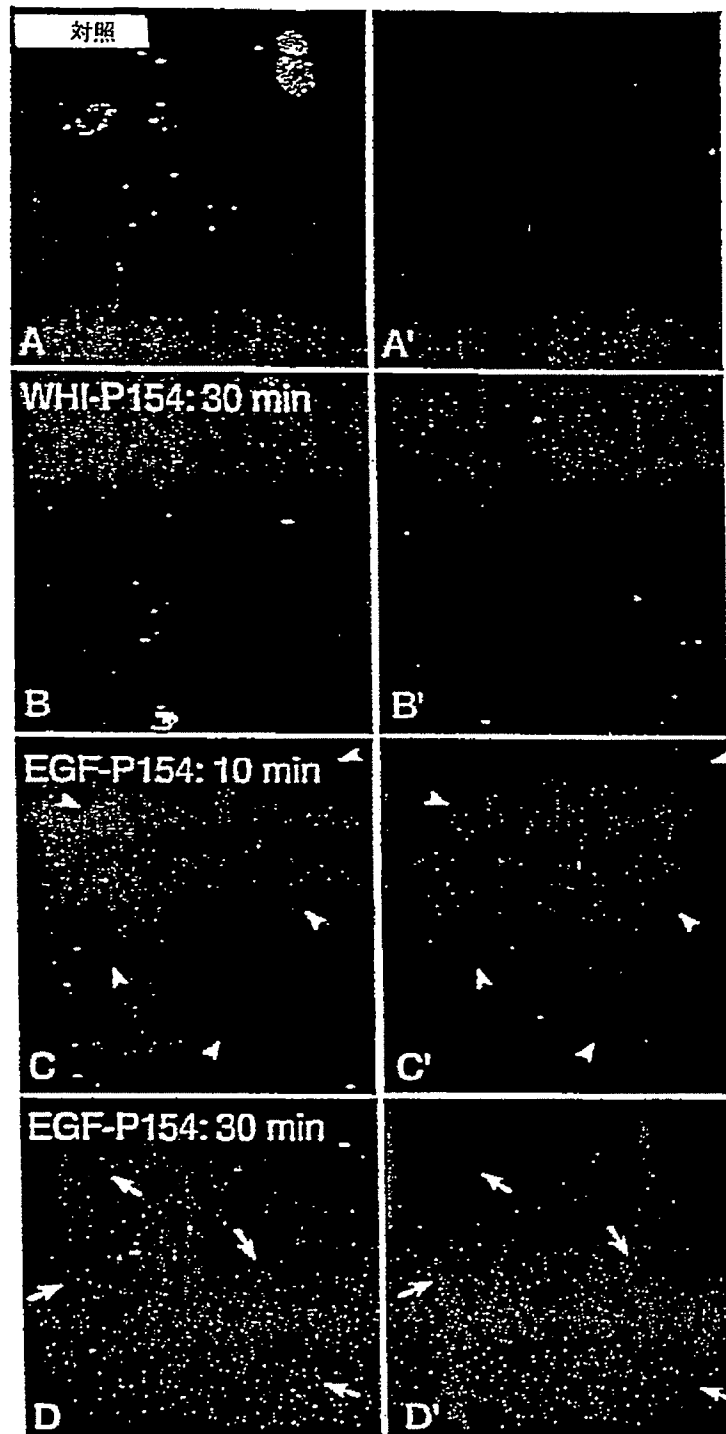


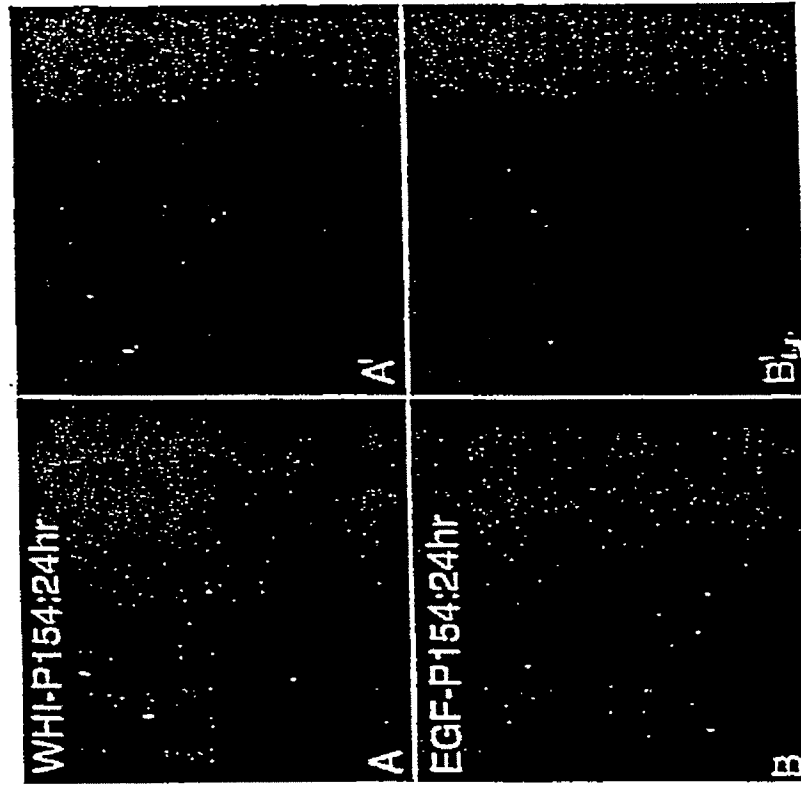
図2B



【図3】



【図4】



【図5】

図5 B

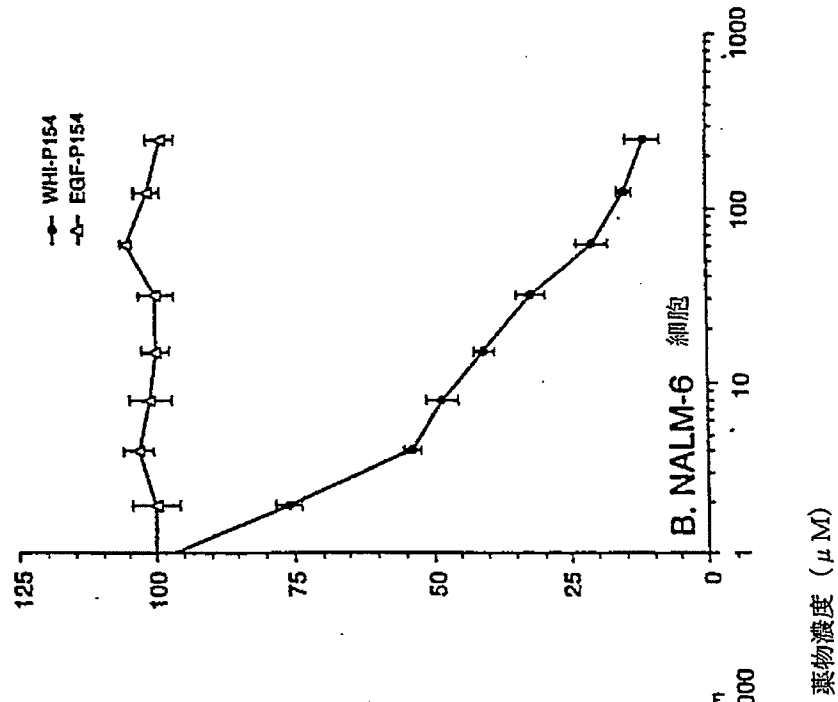
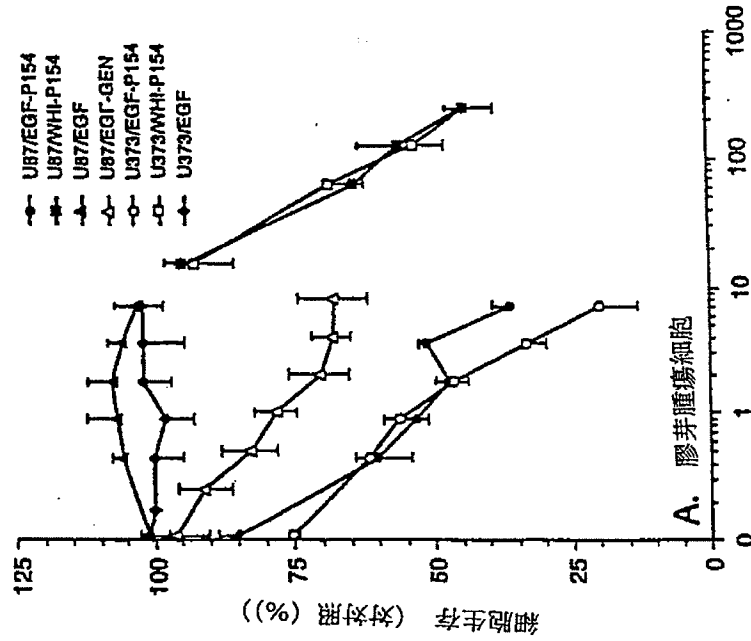
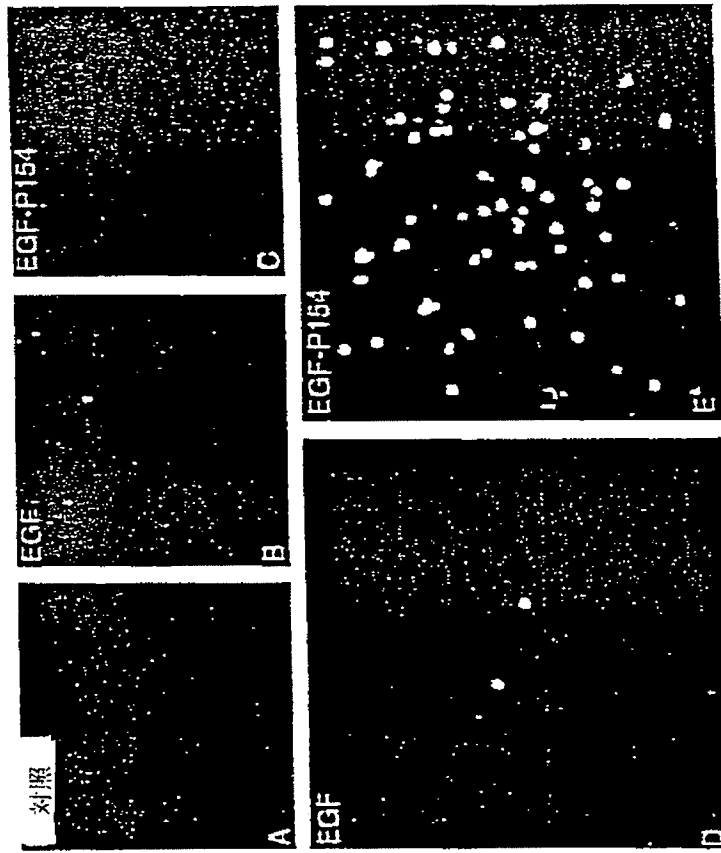


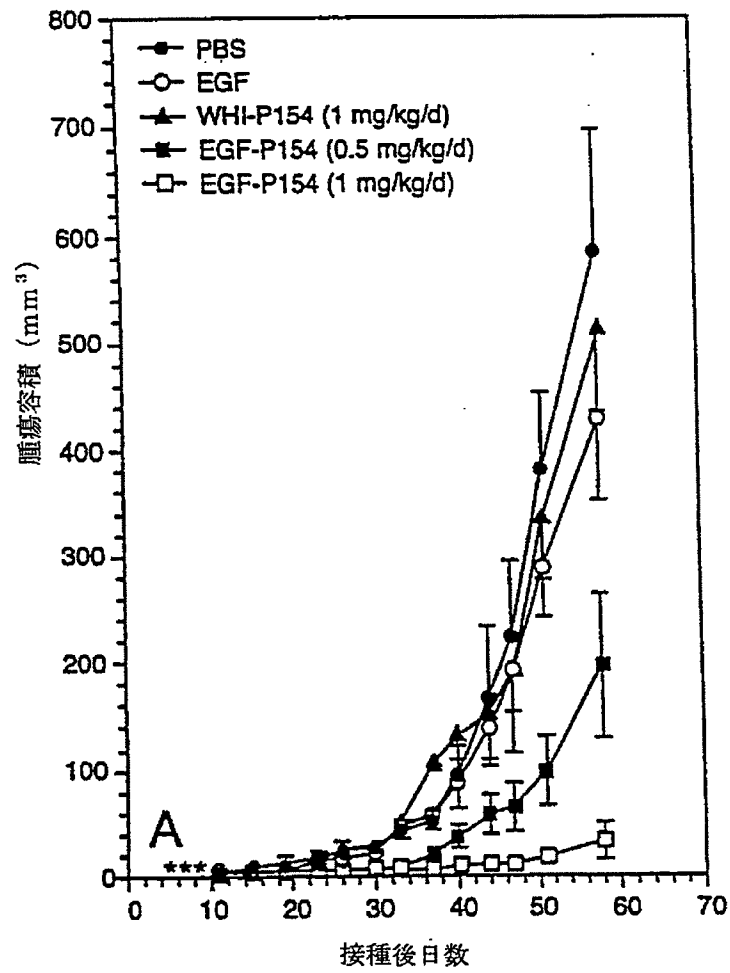
図5 A



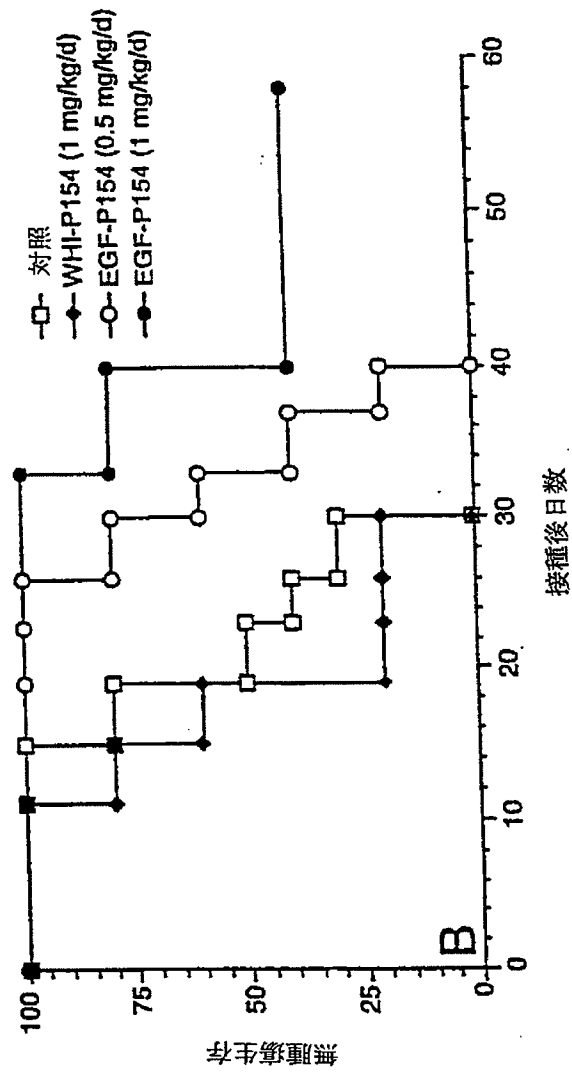
【図6】



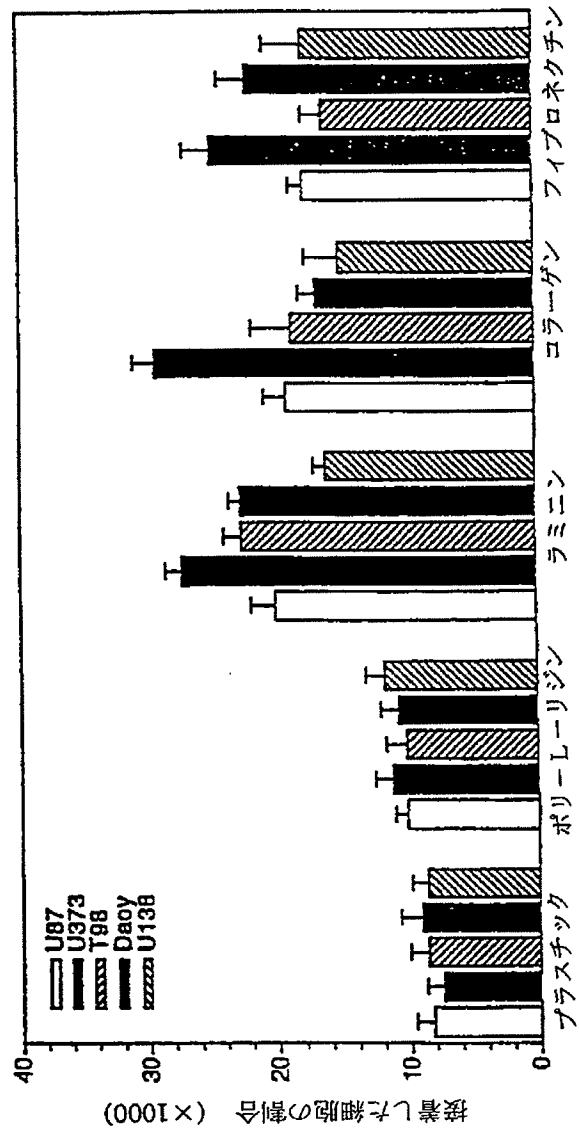
【図7A】



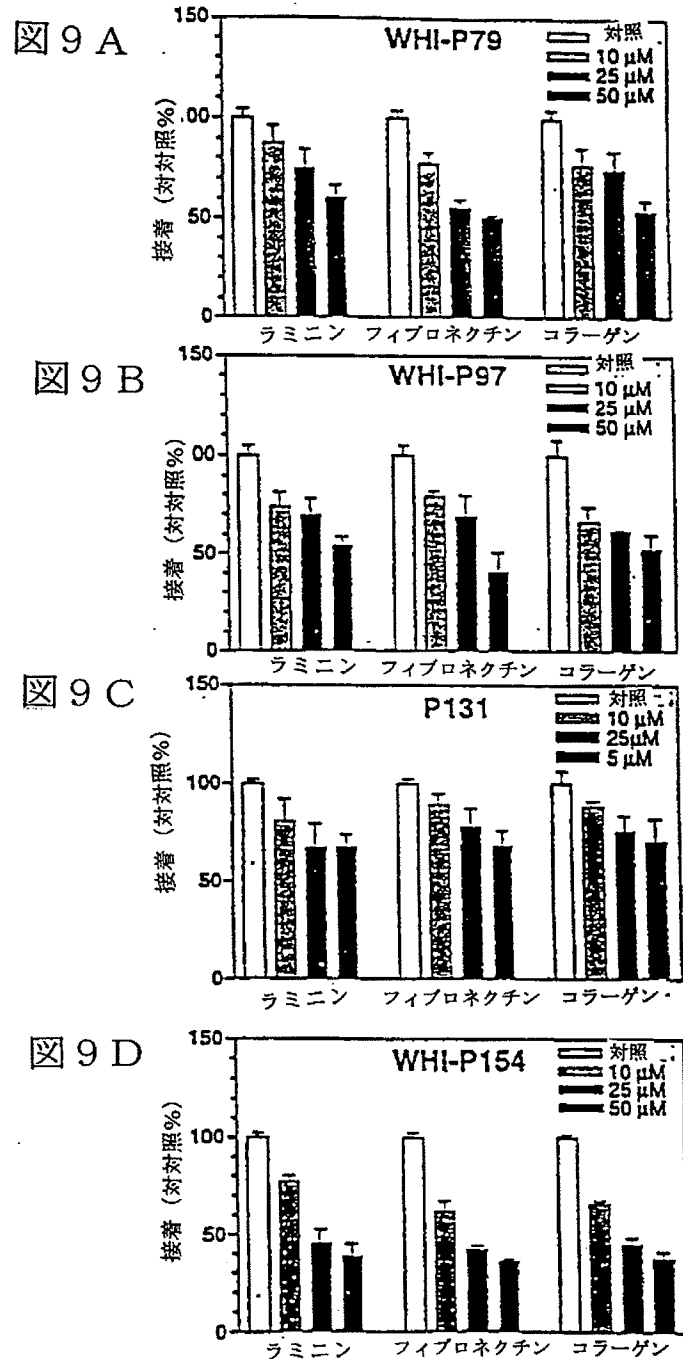
【図7B】



【図8】



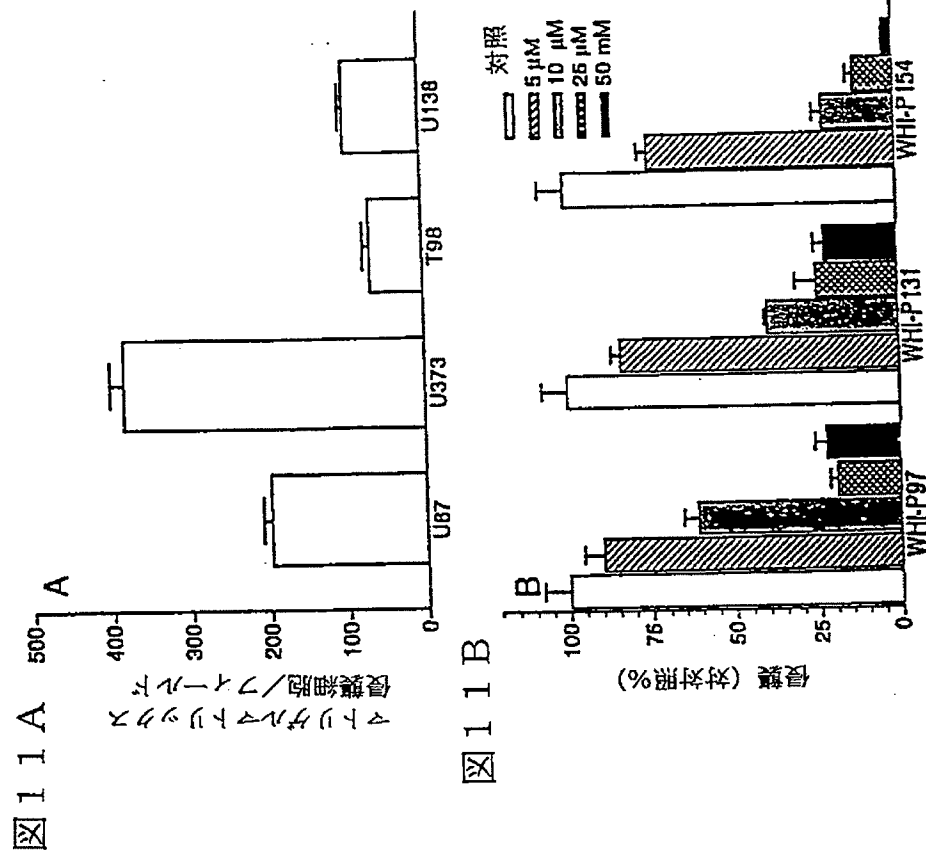
【図9】



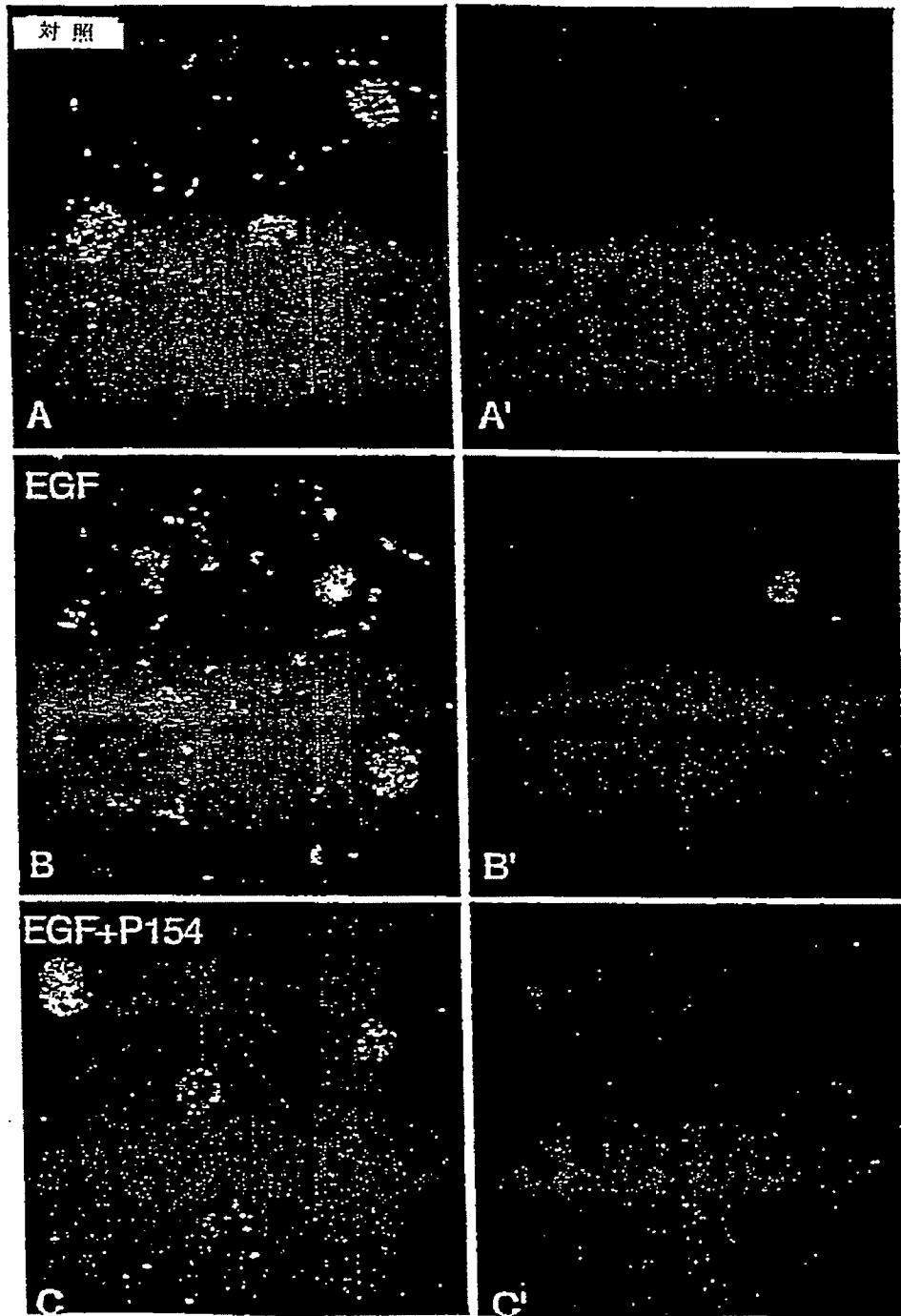
Treatment	EGF	WHI-P154	WHI-P131
CON	-	-	-
EGF	+	-	-
10 μM	+	+	-
25 μM	+	+	-
50 μM	+	+	-
10 μM	+	-	+
25 μM	+	-	+
50 μM	+	-	+
50 μM	+	-	+

* P<0.001 刺激されていない対照との比較(CON)
 ** P<0.0001 EGFにより刺激された対照との比較 (EGF)

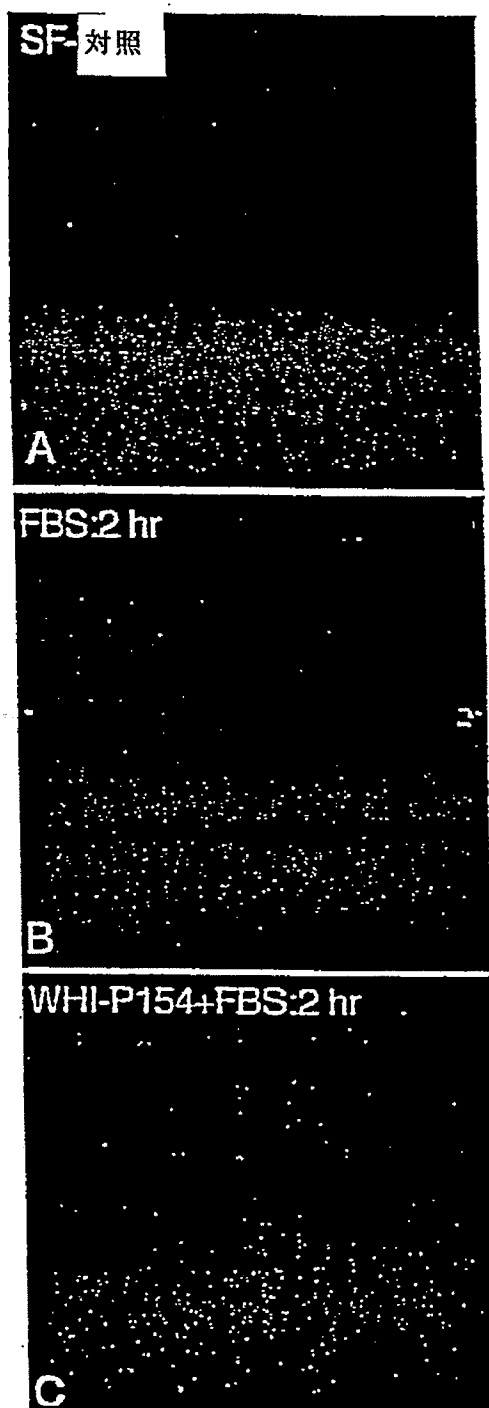
【図11】



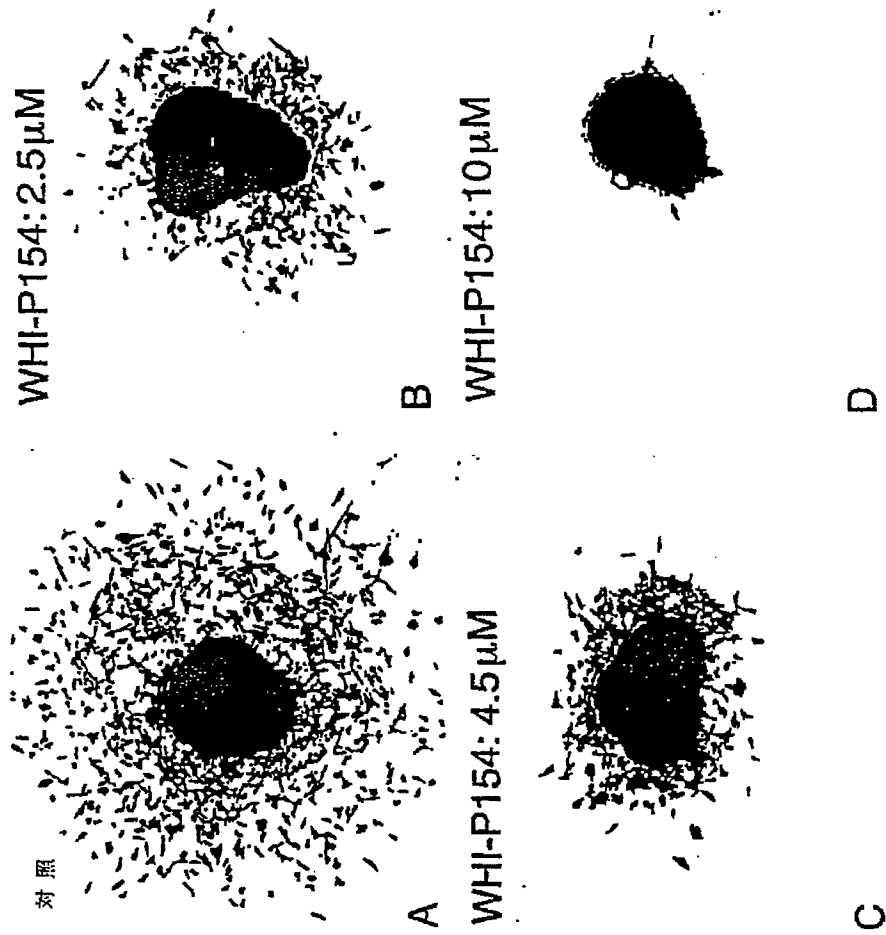
【図12】



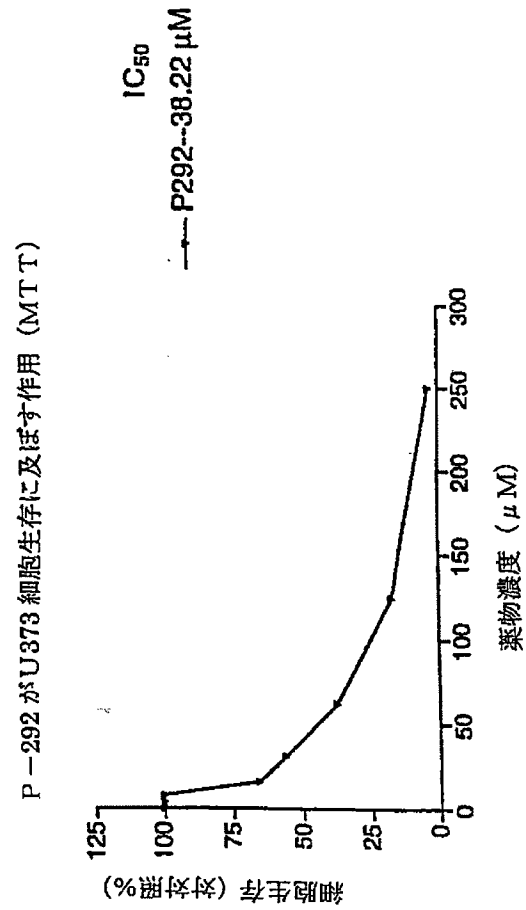
【図13】



【图14】



【図15】



【手続補正書】

【提出日】平成12年11月30日 (2000. 11. 30)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

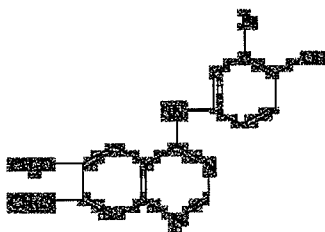
【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

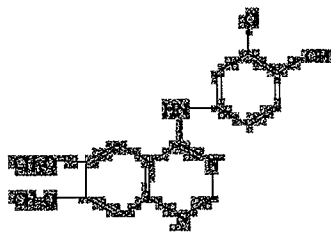
【請求項1】 下記構造式で表される化合物。

【化1】



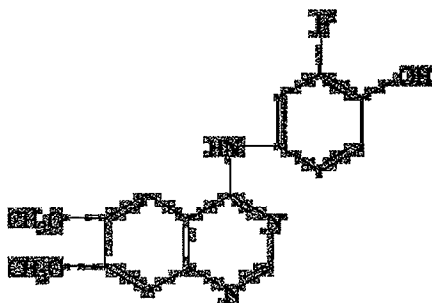
【請求項2】 下記構造式で表される化合物。

【化2】



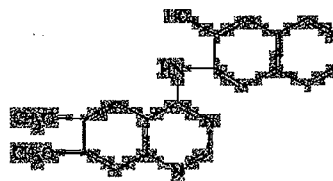
【請求項3】 下記構造式で表される化合物。

【化3】



【請求項4】 下記構造式で表される化合物。

【化4】



【請求項5】 請求項1に記載の化合物と等張担体を含む組成物。

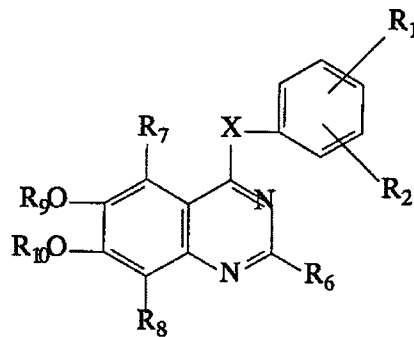
【請求項6】 請求項2に記載の化合物と等張担体を含む組成物。

【請求項7】 請求項3に記載の化合物と等張担体を含む組成物。

【請求項8】 請求項4に記載の化合物と等張担体を含む組成物。

【請求項9】 脳腫瘍細胞をアポトーシス誘発効果量の下記式で表される化合物または薬学的に受け入れられるそれらの酸付加塩に接触させることを含む脳腫瘍細胞のアポトーシスを誘発するための方法。

【化5】



但し、Xは、HN、R₁₁N、CH₂およびR₁₁CHからなる群から選択され；

R₁₁は、H、炭素数4までのアルキル、またはアシルであり、アシルは—C（OR）であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルであり；

R₁は、ハロゲンであり；

R₂は、OHであり；

R₆、R₇およびR₈は、同一でも異なってもよく、それぞれH、OH、SH、NH₂、NO₂、ハロゲン、炭素数4までのアルコキシ、炭素数4までのアルキルチオ、およびアシルからなる群から選択され、アシルは—C（OR）であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルであり；および

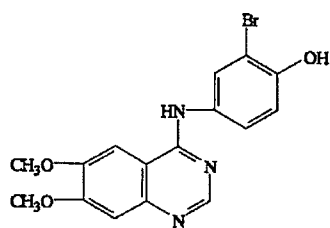
R₉およびR₁₀は、同一でも異なってもよく、それぞれH、炭素数4までのアルキル、およびアシルからなる群から選択され、アシルは—C（OR）であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルである。

【請求項10】 XがHNである請求項10に記載の方法。

【請求項11】 前記化合物が下記式で表される請求項11に記載の方法

。

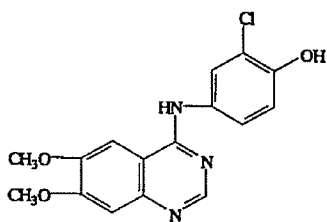
【化6】



【請求項 1 2】 前記化合物が下記式で表される請求項 1 0 に記載の方法

。

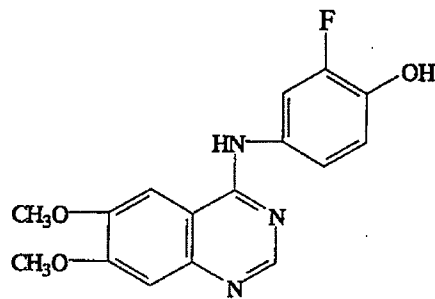
【化 7】



【請求項 1 3】 前記化合物が下記式で表される請求項 1 0 に記載の方法

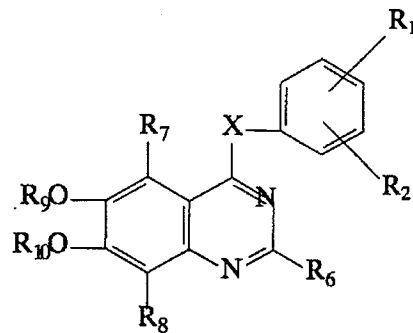
。

【化 8】



【請求項14】 脳腫瘍細胞を下記式で表される化合物または薬学的に受け入れられるそれらの酸付加塩に接触させることを含む脳腫瘍細胞の接着および移動を阻害する方法。

【化9】



但し、Xは、HN、 $R_{11}N$ 、 CH_2 および $R_{11}CH$ からなる群から選択され；

R_{11} は、H、炭素数4までのアルキル、またはアシルであり、アシルは $-C(O R)$ であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルであり；

R_1 は、ハロゲンであり；

R_2 は、OHであり；

R_6 、 R_7 および R_8 は、同一でも異なってもよく、それぞれH、OH、SH、 NH_2 、 NO_2 、ハロゲン、炭素数4までのアルコキシ、炭素数4までのアルキルチオ、およびアシルからなる群から選択され、アシルは $-C(O R)$ であり、Rは

Hまたは炭素数4までのアルキルであり；および

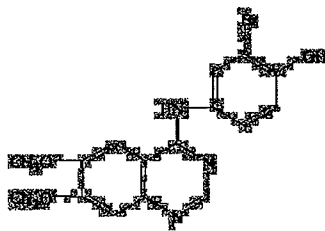
R₉ および R₁₀ は、同一でも異なってもよく、それぞれH、炭素数4までのアルキル、およびアシルからなる群から選択され、アシルは—C(OR)であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルである。

【請求項15】 XがHNである請求項14に記載の方法。

【請求項16】 前記化合物が下記式で表される請求項15に記載の方法

。

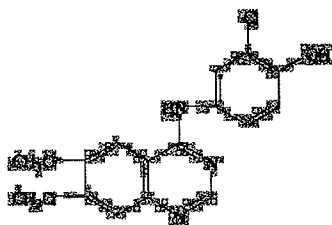
【化10】



【請求項17】 前記化合物が下記式で表される請求項15に記載の方法

。

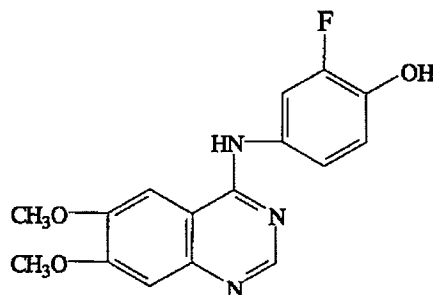
【化11】



【請求項18】 前記化合物が下記式で表される請求項15に記載の方法

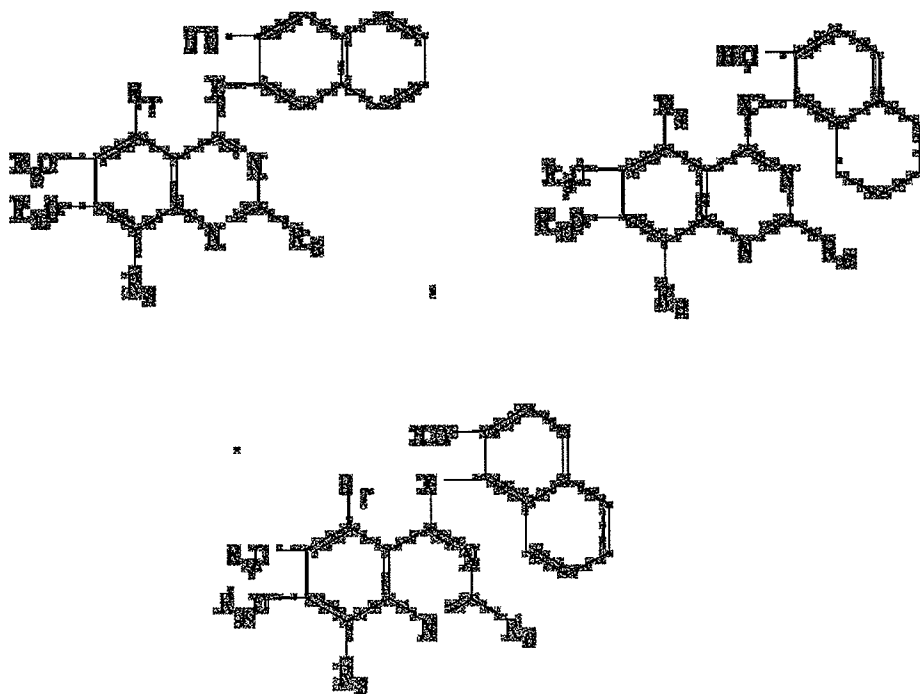
。

【化12】



【請求項19】 脳腫瘍細胞をアポトーシス誘発効果量の下記式で表される化合物または薬学的に受け入れられるそれらの酸付加塩と接触させることを含む脳腫瘍細胞のアポトーシスを誘発する方法。

【化13】



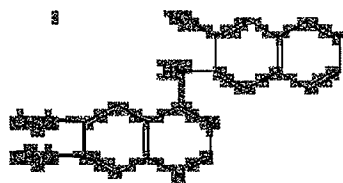
但し、Xは、HN、 R_{11} N、 CH_2 および R_{11} CHからなる群から選択され；
 R_{11} は、H、炭素数4までのアルキル、またはアシルであり、アシルは $-C(O)$ であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルであり；同一でも異なってもよく、それぞれH、OH、SH、 NH_2 、 NO_2 、ハロゲン、炭素数4までのアルコキシ、炭素数4までのアルキルチオ、およびアシルからなる群から選択され、アシルは $-C(OR)$ であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルであり；
 R_6 、 R_7 および R_8 は、同一でも異なってもよく、それぞれH、OH、SH、 NH_2 、 NO_2 、ハロゲン、炭素数4までのアルコキシ、炭素数4までのアルキルチオ、およびアシルからなる群から選択され、アシルは $-C(OR)$ であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルであり；および
 R_9 および R_{10} は、同一でも異なってもよく、それぞれH、炭素数4までのアルキル、およびアシルからなる群から選択され、アシルは $-C(OR)$ であり、RはHまたは炭素数4までのアルキル、または、薬学的に受け入れられるそれらの酸付加塩である。

【請求項20】 XがHNである請求項19に記載の方法。

【請求項21】 前記化合物が下記式で表される請求項20に記載の方法

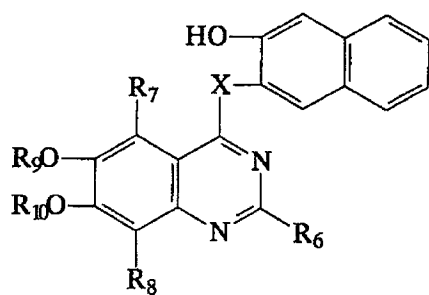
。

【化14】

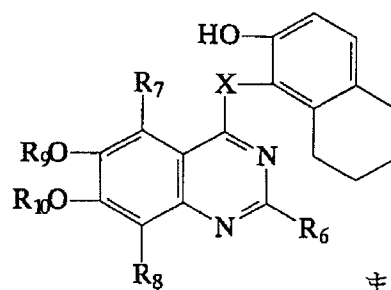


【請求項22】 脳腫瘍細胞を下記式で表される化合物または薬学的に受け入れられるそれらの酸付加塩と接触させることを含む脳腫瘍細胞の接着および移動を阻止する方法。

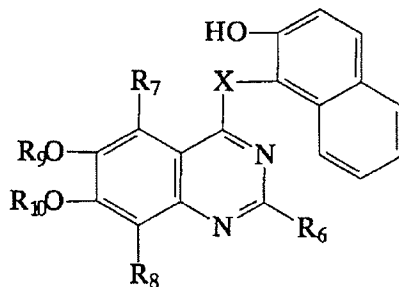
【化15】



,



、または



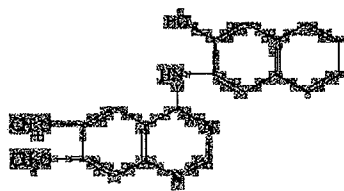
但し、Xは、HN、R₁₁N、CH₂およびR₁₁CHからなる群から選択され；
 R₁₁は、H、炭素数4までのアルキル、またはアシルであり、アシルは-C(OR)であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルであり；同一でも異なってもよく、それぞれH、OH、SH、NH₂、NO₂、ハロゲン、炭素数4までのアルコキシ、炭素数4までのアルキルチオ、およびアシルからなる群から選択され、アシルは-C(OR)であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルであり；
 R₆、R₇およびR₈は、同一でも異なってもよく、それぞれH、OH、SH、NH₂、NO₂、ハロゲン、炭素数4までのアルコキシ、炭素数4までのアルキルチオ、およびアシルからなる群から選択され、アシルは-C(OR)であり、RはHまたは炭素数4までのアルキルであり；および
 R₉およびR₁₀は、同一でも異なってもよく、それぞれH、炭素数4までのアルキル、およびアシルであり、アシルは-C(OR)であり、RはHまたは炭素数4までのアルキル、または、薬学的に受け入れられるそれらの酸付加塩である。

【請求項23】 XがHNである請求項22に記載の方法。

【請求項24】 前記化合物が下記式で表される請求項23に記載の方法

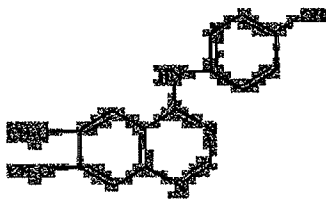
。

【化16】



【請求項25】 脳腫瘍細胞をアポトーシス誘発効果量の下記式で表される化合物と接触させることを含む脳腫瘍細胞のアポトーシスを誘発する方法。

【化17】



【請求項26】 脳腫瘍細胞を下記式で表される化合物と接触させること
を含む脳腫瘍細胞の接着および移動を阻止する方法。

【化18】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 99/11767		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C07D239/94 C07D239/88 C07D239/74 A61K31/505		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 566 226 A (ZENECA) 20 October 1993 (1993-10-20) claims; example 69	1-13, 18, 26, 62, 73
X	WO 97 32856 A (ZENECA) 12 September 1997 (1997-09-12) claims; examples 2, 3	1-3, 8, 12, 18, 62, 73
X	WO 97 30035 A (ZENECA) 21 August 1997 (1997-08-21) claims; examples 1-5, 9, 11, 12	1-9, 12, 25, 62, 73
X	WO 96 15118 A (ZENECA) 23 May 1996 (1996-05-23) claims	1-3, 8, 12, 18, 62, 73
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 August 1999		Date of mailing of the international search report 06/09/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Francois, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 99/11767

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 15758 A (RHONE-POULENC) 15 June 1995 (1995-06-15) claims	1-3, 8, 12, 18, 62, 73
P, X	R. K. NARLA ET AL.: "4-(3'-BROMO-4'-HYDROXYPHENYL)AMINO-6,7-DIM ETHOXYQUINAZOLINE:" CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 4, no. 6, June 1998 (1998-06), pages 1405-1414, XPO02113201 THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH., US ISSN: 1078-0432 page 1404 - page 1407	1-12, 23-27, 62, 73

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 99/11767

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 47
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although claims 47
is directed to a method of treatment of the human/animal
body, the search has been carried out and based on the alleged
effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such
an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all
searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment
of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report
covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is
restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No.

PCT/US 99/11767

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 566226 A	20-10-1993	AT 130000 T	15-11-1995
		AU 661533 B	27-07-1995
		AU 3101093 A	22-07-1993
		CA 2086968 A,C	21-07-1993
		CZ 282038 B	16-04-1997
		DE 69300754 D	14-12-1995
		DE 69300754 T	28-03-1996
		DK 566226 T	18-03-1996
		ES 2078798 T	16-12-1995
		FI 930208 A	21-07-1993
		GR 3018143 T	29-02-1996
		HK 36497 A	04-04-1997
		HU 9500185 A	28-07-1995
		MX 9300277 A	30-06-1994
		NO 301541 B	10-11-1997
		NZ 245662 A	26-09-1995
		SK 1693 A	09-09-1993
		US 5457105 A	10-10-1995
		US 5616582 A	01-04-1997
		ZA 9300015 A	20-07-1993
		JP 6073025 A	15-03-1994
WO 9732856 A	12-09-1997	AU 1866497 A	22-09-1997
		CA 2244897 A	12-09-1997
		CN 1212684 A	31-03-1999
		EP 0885198 A	23-12-1998
		NO 984085 A	04-09-1998
		ZA 9701747 A	27-08-1998
WO 9730035 A	21-08-1997	AU 1729097 A	02-09-1997
		CA 2242425 A	21-08-1997
		CN 1211239 A	17-03-1999
		CZ 9802535 A	11-11-1998
		EP 0880508 A	02-12-1998
		NO 983687 A	13-08-1998
		PL 328310 A	18-01-1999
WO 9615118 A	23-05-1996	AT 175962 T	15-02-1999
		AU 703328 B	25-03-1999
		AU 3813095 A	06-06-1996
		CA 2200871 A	23-05-1996
		DE 69507505 D	04-03-1999
		DE 69507505 T	02-06-1999
		EP 0790986 A	27-08-1997
		ES 2128092 T	01-05-1999
		FI 971970 A	07-05-1997
		JP 10508616 T	25-08-1998
		NO 972152 A	12-05-1997
		NZ 294917 A	25-02-1999
		US 5821246 A	13-10-1998
		ZA 9509572 A	13-05-1996
WO 9515758 A	15-06-1995	US 5480883 A	02-01-1996
		US 5710158 A	20-01-1998
		AU 1305095 A	27-06-1995
		EP 0871448 A	21-10-1998
		SG 54172 A	16-11-1998
		US 5795889 A	18-08-1998

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 99/11767

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9515758 A		US 5646153 A	08-07-1997
		US 5721237 A	24-02-1998
		US 5714493 A	03-02-1998
		US RE36256 E	20-07-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	キーワード(参考)
C 0 7 D 239/93		C 0 7 D 239/93	
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, B J, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), E A(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, G H, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, J P, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, M W, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72)発明者	リウ、クスィンーピン		
	アメリカ合衆国、55414 ミネソタ州、ミ		
	ネアポリス、6 ス ストリート エス. イ		
	ー. 1010		
Fターム(参考)	4C086 AA01 AA03 BC46 MA01 MA02		
	MA04 MA05 NAO5 NA13 NA14		
	ZB26		